

# **Untersuchungen zu parazellulären Barriereeigenschaften von Claudinen**

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades  
**d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m**  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Dipl.-Humanbiologe Christian Piehl**  
geb. am 12.02.1980 in Rostock

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter/innen:    1 Prof. Dr. Werner Kloas  
                             2 PD Dr. Ingolf E. Blasig  
                             3 PD Dr. Joachim Mankertz

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2009

**Diese Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in  
Berlin-Buch durchgeführt.**

**Berlin, 2008**

**Diese Dissertation wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.**

***Meinen Eltern gewidmet.***

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XV</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Epithel- und Endothelzellen.....	1
1.2 Stofftransport und <i>junctional complex</i> .....	2
1.2.1 <i>Tight junctions</i> .....	4
1.2.2 <i>Adherence junctions</i> und Desmosomen.....	6
1.3 Proteine der <i>tight junctions</i> .....	7
1.3.1 Periphere <i>tight junction</i> -Proteine .....	7
1.3.2 Transmembranale <i>tight junction</i> -Proteine.....	8
1.3.2.1 Occludin .....	8
1.3.2.2 <i>Junctional adhesion molecules</i> .....	9
1.3.2.3 Trizellulin .....	10
1.3.3 Claudine.....	11
1.3.4 Die extrazellulären Schleifen der Claudine .....	14
1.3.5 Zytoplasmatische und transmembranale Regionen der Claudine .....	16
1.3.6 Claudininteraktionen.....	17
1.3.7 Claudin-5 und die Blut-Hirn-Schranke.....	19
1.3.8 Claudinassoziierte Erkrankungen.....	20
1.4 Bestimmung des parazellulären Widerstands .....	23
1.4.1 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstands im klassischen Filterkultursystem .....	23
1.4.2 Bestimmung des parazellulären Widerstands im <i>Electric cell-substrate Impedance Sensing</i> -System .....	24
1.4.3 Bestimmung des parazellulären Widerstands im cellZscope.....	24
1.5 Beeinflussung der parazellulären Dichtigkeit von Epithelzellen .....	25
1.5.1 Osmotisch aktive Substanzen .....	25
1.5.2 <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin .....	26
1.5.3 <i>Tight junction</i> -Peptide.....	27
1.5.4 Caprat.....	28



1.5.5	Weitere Ansätze zur Öffnung der <i>tight junctions</i> .....	28
<b>1.6</b>	<b>Zielstellung</b> .....	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>41</b>
2.2.1	Ortsspezifische Mutagenese .....	41
2.2.2	Transformation von Plasmid-DNA .....	44
2.2.3	Kolonie-PCR .....	45
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	46
2.2.5	Minipräparation von Plasmid-DNA .....	47
2.2.6	Midipräparation von Plasmid-DNA .....	47
2.2.7	Maxipräparation von Plasmid-DNA .....	48
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA .....	48
2.2.9	DNA-Sequenzierung .....	49
<b>2.3</b>	<b>Zellkultur</b> .....	<b>50</b>
2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien .....	50
2.3.2	Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zelllinien .....	52
2.3.3	Zellzahlbestimmung .....	52
2.3.4	Mykoplasmentest .....	53
2.3.5	Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zelllinien .....	53
2.3.6	Herstellung stabil transfizierter eukaryotischer Zelllinien .....	54
2.3.7	Immunfluoreszenzfärbungen .....	54
2.3.8	Zelloberflächenbiotinylierung .....	56
2.3.9	Mikroskopische Untersuchungen .....	57
2.3.10	Filterkulturen .....	57
2.3.11	Gefrierbruchelektronenmikroskopie .....	58
<b>2.4</b>	<b>Messung der parazellulären Dichtigkeit</b> .....	<b>59</b>
2.4.1	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands im klassischen Filterkultursystem .....	59
2.4.2	Messung des parazellulären Widerstands im <i>Electric cell-substrate Impedance Sensing</i> -System .....	60
2.4.3	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands mittels cellZscope .....	62

2.4.4	Permeationsmessungen .....	62
2.4.5	Applikation von Claudinpeptiden .....	64
2.4.6	Herstellung kalziumfreier Medien .....	64
2.4.7	Kalziumdepletion und <i>calcium switch assay</i> .....	65
<b>2.5</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>66</b>
2.5.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten für <i>Western Blots</i> .....	66
2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von Gesamtzelllysaten .....	66
2.5.3	Diskontinuierliche <i>sodium dodecyl sulfate</i> -Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	67
2.5.4	<i>Western Blot</i> .....	67
2.5.5	Immunologische Detektion von Proteinbanden auf Membranen .....	68
2.5.6	<i>Strippen</i> von Membranen .....	69
<b>2.6</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>69</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Bedeutung einzelner Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die Integrität der <i>tight junctions</i>.....</b>	<b>71</b>
3.1.1	Subzelluläre Lokalisation verschiedener FLAG-Claudin-5-Proteine in HEK-293-Zellen .. .....	72
3.1.2	Auswahl einer geeigneten Zelllinie für Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit	74
3.1.3	Subzelluläre Lokalisation verschiedener FLAG-Claudin-5-Proteine in MDCK-II-Zellen	77
3.1.3.1	Spezifität des anti-FLAG-Primärantikörpers .....	77
3.1.3.2	Expression von Claudin-5 <sub>wt</sub> und Claudin-5 <sub>Y148A</sub> in MDCK-II-Zellen .....	78
3.1.3.3	Expression von Claudin-5 <sub>R145A</sub> , Claudin-5 <sub>K157A</sub> , Claudin-5 <sub>Y158A</sub> und Claudin-5 <sub>E159Q</sub> in MDCK-II-Zellen .....	80
3.1.4	Analyse der Expression der FLAG-Claudin-5-Proteine in stabil transfizierten MDCK-II- Zellen mittels <i>Western Blot</i> .....	83
3.1.5	Co-Lokalisation von FLAG-Claudin-5-Proteinen mit endogenen <i>tight junction</i> -Proteinen .....	84
3.1.6	Bedeutung einzelner Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die parazelluläre Dichtigkeit von MDCK-II-Zellen .....	89
3.1.6.1	Bedeutung für den parazellulären Widerstand .....	89
3.1.6.2	Bedeutung für die parazelluläre Permeation von Fluoresceindinatriumsalz .....	91
3.1.6.3	Bedeutung für die parazelluläre Permeation von 10 kDa- Fluoresceinisoithiocyanat-Dextran .....	93

3.1.7	Bedeutung einzelner Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die Expression und subzelluläre Lokalisation von <i>tight junction</i> -Proteinen .....	94
3.1.7.1	Periphere <i>tight junction</i> -Proteine: ZO-1 .....	94
3.1.7.2	Transmembranale <i>tight junction</i> -Proteine: JAM-1 .....	95
3.1.8	Bedeutung einzelner Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die Morphologie von <i>tight junction</i> -Strängen .....	97
3.1.9	Rolle des Y148 von Claudin-5 beim Ca <sup>2+</sup> -abhängigen Ab- und Aufbau von <i>tight junctions</i> .....	98
<b>3.2</b>	<b><i>Tight junction</i>-modulierende Peptide .....</b>	<b>101</b>
3.2.1	Wirkung von Claudinpeptiden auf den parazellulären Widerstand von Epithelzellen im <i>Electric cell-substrate Impedance Sensing</i> -System .....	101
3.2.2	Wirkung von Claudinpeptiden auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen im Filterkultursystem .....	103
3.2.2.1	Claudin-1 <sub>53-81</sub> .....	103
3.2.2.2	Claudin-2 <sub>53-81</sub> .....	109
3.2.2.3	Claudin-5 <sub>53-81</sub> .....	110
3.2.2.4	Claudin-3 <sub>140-159</sub> .....	112
3.2.2.5	Das Glycinrezeptorpeptid „GlyR-TDM“ .....	113
3.2.2.6	Claudin-1 <sub>1-31</sub> .....	114
3.2.2.7	Zusammenfassung .....	116
3.2.3	Wirkung von CPE-Peptiden auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen .....	116
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>121</b>
<b>4.1</b>	<b>Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die Integrität von <i>tight junctions</i> .....</b>	<b>121</b>
4.1.1	Auswahl geeigneter Cld5-Proteine und einer geeigneten Zelllinie für Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit .....	122
4.1.2	Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für dessen subzelluläre Lokalisation .....	123
4.1.3	Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für den transepithelialen elektrischen Widerstand .....	125
4.1.4	Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die parazelluläre Abdichtung gegenüber kleinen Molekülen .....	128
4.1.5	Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die parazelluläre Abdichtung gegenüber großen Molekülen .....	130

4.1.6	Zusammenfassung der Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen .....	132
4.1.7	Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die Morphologie der <i>tight junction</i> -Stränge .....	135
<b>4.2</b>	<b><i>Tight junction</i>-modulierende Substanzen .....</b>	<b>135</b>
4.2.1	Claudinpeptide .....	136
4.2.2	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin .....	139
4.2.3	Abhängigkeit der Wirkung von <i>tight junction</i> -modulierenden Peptiden vom Applikationsort .....	140
<b>4.3</b>	<b>Probleme bei der Messung des parazellulären Widerstands .....</b>	<b>142</b>
<b>5</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>146</b>
	<b>REFERENZEN .....</b>	<b>149</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	<b>Stofftransport durch epitheliale und endothelialen Zellen</b> (modifiziert nach [Tsukita, 00])	<b>2</b>
<b>Abbildung 2</b>	<b>Aufbau des <i>junctional complex</i> am Beispiel einer Epithelzelle</b> (modifiziert nach [Johnson, 05a])	<b>3</b>
<b>Abbildung 3</b>	<b>Ultradünne elektronenmikroskopische Aufnahme der TJ-Region primärer humaner Retinaepithelzellen (A).</b> Die Pfeile zeigen Bereiche, in denen sich die Plasmamembranen der beiden Zellen bis auf wenige Mikrometer nähern ( <i>kissing points</i> ) [Rajasekaran, 08]. <b>Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Aufnahme der von Claudinen gebildeten TJ-Stränge in einer Darmepithelzelle (B).</b> Die apikal lokalisierten Mikrovilli (MV) ragen ins Darmlumen. Die TJ erscheinen als kontinuierliches Netzwerk. Maßstab: 0,5 $\mu\text{m}$ [Achler, 89].	<b>5</b>
<b>Abbildung 4</b>	<b>Allgemeine Struktur und Topologie von Claudinen.</b> Die Positionen konservierter geladener Aminosäuren sind mit „+“ und „-“ gekennzeichnet [Gonzalez-Mariscal, 03]	<b>12</b>
<b>Abbildung 5</b>	<b>Schematische Darstellung möglicher homophiler und heterophiler Claudininteraktionen</b>	<b>19</b>
<b>Abbildung 6</b>	<b>Schematische Darstellung des Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke</b> (modifiziert nach [Miller, 04])	<b>20</b>
<b>Abbildung 7</b>	<b>Schematische Darstellung einer TER-Messung im Filterkultursystem</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 8</b>	<b>Schematische Darstellung einer Widerstandsmessung im ECIS-System.</b> Innerhalb der gemessenen Impedanz wird zwischen dem parazellulären Widerstand $R_b$ und dem Widerstand $\alpha$ , der aus der Adhäsion der Zellen an das Substrat resultiert, unterschieden. $C_m$ bezeichnet die Membrankapazität, die Rückschlüsse auf die Zellmorphologie erlaubt [Giaever, 91].	<b>62</b>
<b>Abbildung 9</b>	<b>Schematische Darstellung der durch ortsspezifische Mutagenese hergestellten Flag-Cld5-Proteine.</b> Die Positionen der Aminosäuresubstitutionen sind mit roten Punkten gekennzeichnet.	<b>73</b>
<b>Abbildung 10</b>	<b>Die subzelluläre Lokalisation der FLAG-Cld5-Proteine stimmt mit der Lokalisation der entsprechenden Cld5-YFP-Proteine von [Piontek, 08] in stabil transfizierten HEK-293-Zellen überein.</b> Die Zellen wurden stabil mit FLAG-Cld5 <sub>wt</sub> , FLAG-Cld5 <sub>R145A</sub> , FLAG-Cld5 <sub>Y148A</sub> , FLAG-Cld5 <sub>K157A</sub> , FLAG-Cld5 <sub>Y158A</sub> oder FLAG-Cld5 <sub>E159Q</sub> transfiziert. Cld5 (grün) wurde durch Immunfluoreszenzfärbung mit einem monoklonalen Maus-anti-Cld5-Antikörper detektiert. Die Plasmamembran (rot) wurde mittels Oberflächenbiotinylierung gefärbt (2.3.8). Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. In der Überlagerung erscheinen Cld5-Signale in der Plasmamembran gelb. FLAG-Cld5 <sub>wt</sub> und FLAG-Cld5 <sub>R145A</sub> wiesen eine Kontaktanreicherung in den benachbarten Plasmamembranen transfizierter Zellen auf (Pfeile). FLAG-Cld5 <sub>Y148A</sub> , FLAG-Cld5 <sub>K157A</sub> und FLAG-Cld5 <sub>E159Q</sub> waren kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt (Pfeilspitzen). FLAG-Cld5 <sub>K157A</sub> war intrazellulär lokalisiert (Sternchen). Maßstab: 5 $\mu\text{m}$ .	<b>75</b>

<b>Abbildung 11</b>	<b>Zelllinien weisen unterschiedliche TER-Werte auf.</b> Der TER wurde vier Tage nach Aussaat von 150.000 Zellen pro/cm <sup>2</sup> gemessen. Zuvor wurden die Filter für NRC und hCMEC/D3 mit Rattenschwanzkollagen und für HEK-293-Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Während NRC, MDCK-I-, MDCK-II- und Caco-2-Zellen hohe TER-Werte generierten, wiesen hCMEC/D3 und HEK-293-Zellen TER-Werte $\leq 10 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf, die sich nicht signifikant vom TER zellfreier Filter unterschieden (Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem <i>Dunn's post-Test</i> , $n \geq 10$ , n.d.: nicht detektierbar).	<b>76</b>
<b>Abbildung 12</b>	<b>Detektion endogener TJ-Proteine in MDCK-II-Zellen und NRC mittels Western Blot.</b> Die Proteine wurden wie unter 2.5.5 beschrieben detektiert. Sowohl MDCK-II-Zellen als auch NRC exprimierten alle untersuchten TJ-Proteine. B-Aktin diente als Ladungskontrolle.	<b>77</b>
<b>Abbildung 13</b>	<b>Verschiedene Chargen des Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers unterschieden sich in ihrer Spezifität.</b> Untransfizierte MDCK-II-Zellen wurden für Immunfluoreszenzfärbungen mit verschiedenen Chargen des polyklonalen anti-FLAG-Primärantikörpers eingesetzt: Charge A, die zur Färbung von FLAG-Cld5 <sub>wt</sub> oder FLAG-Cld5 <sub>Y148A</sub> -exprimierenden MDCK-II-Zellen verwendet wurde ( <b>A</b> ), Charge B, die zur Färbung von MDCK-II-Zellen verwendet wurde, die die übrigen FLAG-Cld5-Mutanten exprimierten ( <b>B</b> ) und Charge C, die für Färbungen von FLAG-Cld5-Proteinen ungeeignet war, da starke Hintergrundsignale auftraten, die eine Abgrenzung des exogenen FLAG-Signals vom Hintergrund nicht mehr gestatteten ( <b>C</b> ). Für alle drei Chargen wurde eine Verdünnung von 1:300 eingesetzt. Maßstab: 5 $\mu\text{m}$ .	<b>79</b>
<b>Abbildung 14</b>	<b>FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> sind in transient transfizierten MDCK-II-Zellen kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt.</b> Immunfluoreszenzfärbungen mit der Charge A des polyklonalen Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers (rot) gegen das FLAG-Epitop von FLAG-Cld5 <sub>wt</sub> ( <b>A</b> ) und FLAG-Cld5 <sub>Y148A</sub> ( <b>B</b> ). MDCK-II-Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden ( <b>C</b> ), dienten als Negativkontrolle. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 5 $\mu\text{m}$ .	<b>80</b>
<b>Abbildung 15</b>	<b>FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> sind in stabil transfizierten MDCK-II-Zellen kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt.</b> Immunfluoreszenzfärbungen mit der Charge A des polyklonalen Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers (rot) gegen das FLAG-Epitop von FLAG-Cld5 <sub>wt</sub> ( <b>A</b> ) und FLAG-Cld5 <sub>Y148A</sub> ( <b>B</b> ). MDCK-II-Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden ( <b>C</b> ), dienten als Negativkontrolle. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 $\mu\text{m}$ .	<b>80</b>
<b>Abbildung 16</b>	<b>FLAG-Cld5<sub>R145A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> und FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> sind in transient transfizierten MDCK-II-Zellen kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt, wohingegen FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> intrazellulär lokalisiert ist.</b> Immunfluoreszenzfärbung mit der Charge B des polyklonalen Kaninchen anti-FLAG-Primärantikörper (rot) gegen das FLAG-Epitop von FLAG-Cld5 <sub>wt</sub> ( <b>A</b> ), FLAG-Cld5 <sub>R145A</sub> ( <b>B</b> ), FLAG-Cld5 <sub>K157A</sub> ( <b>C</b> ), FLAG-Cld5 <sub>Y158A</sub> ( <b>D</b> ), FLAG-Cld5 <sub>E159Q</sub> ( <b>E</b> ). MDCK-II-Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden ( <b>F</b> ), dienten als Negativkontrolle. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 $\mu\text{m}$ .	<b>82</b>
<b>Abbildung 17</b>	<b>FLAG-Cld5<sub>R145A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> und FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> sind in stabil transfizierten MDCK-II-Zellen kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt, wohingegen FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> intrazellulär lokalisiert ist.</b>	<b>83</b>

- siert ist.** Immunfluoreszenzfärbung mit der Charge B des polyklonalen Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers (rot) gegen das FLAG-Epitop von FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> (A), FLAG-Cld5<sub>R145A</sub> (B), FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> (C), FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> (D), FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> (E). MDCK-II-Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden (F), dienten als Negativkontrolle. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 µm.
- Abbildung 18** **Alle untersuchten stabilen MDCK-II-Zellklone exprimierten vergleichbare Mengen der exogenen FLAG-Cld5-Proteine und des endogenen Cld1.** Analyse von Gesamtzellextrakten mit einem monoklonalen Maus-anti-Cld5-Primärantikörper (A) und einem polyklonalen Kaninchen-anti-Cld1-Primärantikörper (B) im Western Blot. Die Detektion von GAPDH diente zur Normalisierung der eingesetzten Proteinmengen. Mit Ausnahme der Vektorkontrolle exprimierten alle MDCK-II-Klone vergleichbare Mengen der FLAG-Cld5-Proteine (A). Die exogene Expression von Cld5 hatte keinen Einfluss auf die endogene Expression von Cld1 (B). 84
- Abbildung 19** **Alle stabil exprimierten FLAG-Cld5-Proteine außer FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> co-lokalisieren mit endogenem Occludin in MDCK-II-Zellen.** Die Zellen wurden fünf Tage auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden Cld5 (grün) und Occludin (rot) mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung detektiert. Stellen der Co-Lokalisation von Cld5 und Occludin ergaben in der Überlagerung gelbe Signale. Maßstab: 10 µm. 87
- Abbildung 20** **Alle stabil exprimierten FLAG-Cld5-Proteine außer FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> co-lokalisieren mit endogenem Cld1 in MDCK-II-Zellen.** Die Zellen wurden fünf Tage auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden Cld5 (grün) und Cld1 (rot) mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung detektiert. Stellen der Co-Lokalisation von Cld5 und Cld1 ergaben in der Überlagerung gelbe Signale. Die z-Richtung wurde vergrößert dargestellt (Pfeil). Die unterschiedlichen Größen der überlagerten Signale in z-Richtung resultierten aus den verschiedenen Verläufen der Plasmamembranen zur jeweiligen Schnittebene. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. MDCK-II-Zellen, die mit FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> oder dem Kontrollvektor transfiziert wurden, zeigten keine Co-Lokalisation von Cld5 und Cld1 in der Plasmamembran. Maßstab: 5 µm. 90
- Abbildung 21** **Die Aminosäuren R145, Y148, K157, Y158 und E159 von Cld5 sind für die von Cld5<sub>wt</sub> vermittelte Erhöhung des TER essentiell.** MDCK-II-Zellklone, die die angegebenen FLAG-Cld5-Proteine stabil exprimierten, wurden auf Filtern ausgesät. Für jedes FLAG-Cld5-Protein wurden mindestens zwei Klone und neun bis zwölf Filter verwendet. Nach drei Tagen wurde der TER gemessen. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM), \*\*\* p < 0,0001 im Vergleich zur Vektorkontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*, n ≥ 10. 91
- Abbildung 22** **MDCK-II-Zelllinien, die mit FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> oder dem Kontrollvektor stabil transfiziert wurden, bilden im ECIS-System keine unterschiedlichen parazellulären Widerstände aus.** Dargestellt sind die R<sub>b</sub>-Werte von je drei verschiedenen FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> und Kontrollvektor-MDCK-II-Zellklonen. 92
- Abbildung 23** **Die Aminosäuren R145, Y148, K157, Y158 und E159 von Cld5 sind für die parazelluläre Dichtigkeit gegenüber FDS essentiell.** MDCK-II-Zellklone, die die angegebenen FLAG-Cld5-Proteine stabil exprimierten, wurden auf Filtern ausgesät. Für jedes FLAG-Cld5-Protein wurden min- 93

destens zwei Klone und zehn Filter verwendet. Nach vier Tagen wurde der TER gemessen. Nachdem die Zellen einen konstanten TER erreicht hatten, wurden die Permeationsmessungen durchgeführt. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Vektorkontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n \geq 10$ .

- Abbildung 24** Die Aminosäuren Y148, Y158 und E159 von Cld5 sind für die parazelluläre Dichtigkeit gegenüber FD10 essentiell. MDCK-II-Zellklone, die die angegebenen FLAG-Cld5-Proteine stabil exprimierten, wurden auf Filtern ausgesät. Für jedes FLAG-Cld5-Protein wurden mindestens zwei Klone und neun Filter verwendet. Nach vier Tagen wurde der TER gemessen. Nachdem die Zellen einen konstanten TER erreicht hatten, wurden die Permeationsmessungen durchgeführt. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Vektorkontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n \geq 10$ . 95
- Abbildung 25** R145, Y148, K157, Y158 und E159 von Cld5 sind für die Expression und subzelluläre Lokalisation von endogenem ZO-1 in FLAG-Cld5 stabil exprimierenden MDCK-II-Zellen nicht relevant. MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub> (A), FLAG-Cld5<sub>R145A</sub> (B), FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> (C), FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> (D), FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> (E) oder FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> (F) stabil exprimierten, wurden fünf Tage auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurde ZO-1 (grün) mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 5  $\mu$ m. 96
- Abbildung 26** Die stabile Transfektion von MDCK-II-Zellen mit FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> führte im Gegensatz zu FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> zum Verlust der Plasmamembranlokalisation von JAM-1. MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> oder FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> stabil exprimierten, wurden fünf Tage auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden JAM-1 (rot) und Cld5 (grün) mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Stellen der Co-Lokalisation von JAM-1 und Cld5 ergaben in der Überlagerung gelbe Signale. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10  $\mu$ m. 97
- Abbildung 27** Die Expression der verschiedenen FLAG-Cld5-Proteine hat auf die Strangmorphologie der TJ von MDCK-II-Zellen keinen Einfluss. Gefrierbrüchelektronenmikroskopische Aufnahmen von MDCK-II-Zellen, die den Kontrollvektor (A), FLAG-Cld5<sub>wt</sub> (B), Flag-Cld5<sub>R145A</sub> (C) und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> (D) exprimierten. PF kennzeichnet die protoplasmatische und EF die exoplasmatische Hälfte der Plasmamembran. 98
- Abbildung 28** Y148 von Cld5 ist nicht an der Regulierung der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Internalisierung von Cld5 beteiligt. MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub> oder FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> stabil exprimierten, wurden zunächst in Ca<sup>2+</sup>-haltigem MDCK-II-Standardmedium kultiviert und zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz auf Ca<sup>2+</sup>-freies Medium umgestellt. Die Zellen wurden sofort danach oder 30, 60, 120 und 180 min später fixiert. Cld1 (grün) und Cld5 (rot) wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Die Überlagerung der beider Signale erschien gelb. Die Zellkerne (blau) wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt. Maßstab: 5  $\mu$ m. 100
- Abbildung 29** Y148 von Cld5 ist nicht am Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Wiedereinbau von Cld5 in die TJ beteiligt. MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub> oder FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> stabil exprimierten, wurden zunächst in Ca<sup>2+</sup>-haltigem MDCK-II-Standardmedium kultiviert. Zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz wurden sie 16 h in Ca<sup>2+</sup>-freiem S-MEM kultiviert. Anschließend wurde 101



das S-MEM gegen MDCK-II-Standardmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden sofort danach oder 15, 30, 60, 120, 180 und 240 min später Zellen fixiert. Cld1 (grün) und Cld5 (rot) wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Die Zellkerne (blau) wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt. FLAG-Cld5<sub>wt</sub> oder FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> wurden mit ähnlicher Geschwindigkeit in die TJ reintegriert. Maßstab: 5 µM.

- Abbildung 30** **Übersicht über die verwendeten Claudinpeptide.** Der Abschnitt der Claudine, der als Vorlage für die jeweiligen Peptide diente, ist rot markiert. 102
- Abbildung 31** **Die apikal applizierten Claudinpeptide beeinflussen den  $R_b$  von Caco-2-Zellen im ECIS-System nicht.** Caco-2-Zellen wurden auf ECIS-Trägern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* apikal mit 400 µM Cld1<sub>53-81</sub> (grün) (A), Cld2<sub>53-81</sub> (blau) (B), Cld5<sub>53-81</sub> (schwarz) (C), Cld3<sub>140-159</sub> (rot) (D) oder Cld1<sub>1-31</sub> (rot) (E) behandelt. Die zweite Kurve in jeder Abbildung repräsentiert den parazellulären Widerstand der Kontrolle. Die parazellulären Widerstände der peptidbehandelten Caco-2-Zellen unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle gemäß Mann-Whitney-U-Test, n = 6. 103
- Abbildung 32** **Cld1<sub>53-81</sub> reduziert den TER von Caco-2-Zellen bei basolateraler oder beidseitiger Applikation, jedoch nicht bei apikaler Zugabe.** Caco-2-Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* apikal, basolateral oder beidseitig mit 300 µM Cld1<sub>53-81</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Mittelwert ± SEM, \* p < 0.01 im Vergleich zur Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*, n ≥ 6. 104
- Abbildung 33** **Cld1<sub>53-81</sub> erhöht die parazelluläre Permeation von FDS bei Caco-2-Zellen bei basolateraler und beidseitiger Applikation.** Die Permeationsmessungen wurden im Anschluss an die 48-stündige Inkubation der Caco-2-Zellen mit 300 µM Cld1<sub>53-81</sub> durchgeführt. Zellen, die basolateral oder beidseitig mit Cld1<sub>53-81</sub> behandelt wurden, wiesen im Vergleich zur Kontrolle und zu den apikal behandelten Zellen eine signifikant erhöhte parazelluläre Permeation von FDS auf. Mittelwert ± SEM, \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*, n ≥ 6. 105
- Abbildung 34** **Cld1<sub>53-81</sub> erhöht die parazelluläre Permeation von FD10 bei Caco-2-Zellen bei beidseitiger.** Die Permeationsmessungen wurden im Anschluss an die 48-stündige Inkubation der Caco-2-Zellen mit 300 µM Cld1<sub>53-81</sub> durchgeführt. Nur die beidseitig behandelten Zellen wiesen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant erhöhte parazelluläre Permeation von FD10 auf. Mittelwert ± SEM, \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*, n ≥ 6. 106
- Abbildung 35** **Die Reduktion des TER von Caco-2-Zellen durch basolateral oder beidseitig appliziertes Cld1<sub>53-81</sub> ist reversibel.** Caco-2-Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* 48 h apikal, basolateral oder beidseitig mit 300 µM Cld1<sub>53-81</sub> behandelt. Im Anschluss wurde Cld1<sub>53-81</sub> durch einen Mediumwechsel ausgewaschen. Nach 48-stündiger Inkubation im peptidfreien Medium unterschied sich der TER der basolateral oder beidseitig behandelten Zellen nicht mehr signifikant von der Kontrolle (Mittelwert ± SEM, \* p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit an-

schließendem *Dunn's post-Test*,  $n \geq 6$ .

- Abbildung 36** **Beidseitig appliziertes Cld1<sub>53-81</sub> führt zur reversiblen Reduktion des TER von MDCK-II-Zellen.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld1<sub>53-81</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Die beidseitig behandelten MDCK-II-Zellen wiesen 24 und 48 h nach der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle einen signifikant reduzierten TER auf. Cld1<sub>53-81</sub> wurde nach 48 h durch einen Mediumwechsel ausgewaschen (Pfeil). Nach 24-stündiger Inkubation im peptidfreien Medium unterschied sich der TER der Zellen nicht mehr signifikant von der Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.0001$  im Vergleich zur Kontrolle gemäß Mann-Whitney-U-Test,  $n = 6$ . **108**
- Abbildung 37** **Cld1<sub>53-81</sub> erhöht die parazelluläre Permeation von FDS und FD10 bei MDCK-II-Zellen.** Die Permeationsmessungen wurden im Anschluss an die 48-stündige Inkubation der MDCK-II-Zellen mit 300  $\mu$ M Cld1<sub>53-81</sub> durchgeführt Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle und \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle gemäß Mann-Whitney-U-Test,  $n = 6$ . **109**
- Abbildung 38** **Cld2<sub>53-81</sub> hat keinen Einfluss auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco-2-Zellen.** Caco-2-Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld2<sub>53-81</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen (**A**). Die Behandlung mit Cld2<sub>53-81</sub> (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zu keiner signifikanten Änderung des TER (Mittelwert  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*). Die parazelluläre Permeation von FDS (**B**) und FD10 (**C**) unterschied sich nach 48-stündiger Behandlung der Zellen mit Cld2<sub>53-81</sub> ebenfalls nicht signifikant von der Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test,  $n = 6$ . **111**
- Abbildung 39** **Cld5<sub>53-81</sub> hat keinen Einfluss auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco-2-Zellen.** Caco-2-Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld5<sub>53-81</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen (**A**). Die Behandlung mit Cld5<sub>53-81</sub> (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zu keiner signifikanten Änderung des TER (Mittelwert  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*). Die parazelluläre Permeation von FDS (**B**) und FD10 (**C**) unterschied sich nach 48-stündiger Behandlung der Zellen mit Cld5<sub>53-81</sub> ebenfalls nicht signifikant von der Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test,  $n = 6$ . **112**
- Abbildung 40** **Cld5<sub>53-81</sub> hat keinen Einfluss die parazelluläre Dichtigkeit von Cld5<sub>wt</sub> stabil exprimierenden MDCK-II-Zellen.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld5<sub>53-81</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 24, 48 und 72 h danach gemessen. Die beidseitige Behandlung mit Cld5<sub>53-81</sub> (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zu keiner signifikanten Änderung des TER Mittelwert  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n = 6$ ). **113**
- Abbildung 41** **Cld3<sub>140-159</sub> hat keinen Einfluss auf den TER von Caco-2-Zellen.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines **114**

konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld3<sub>140-159</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Die Behandlung mit Cld3<sub>140-159</sub> (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zu keiner signifikanten Änderung des TER. Mittelwert  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*, n = 6.

- Abbildung 42 GlyR-TMD reduziert den TER nach Behandlung von Caco-2-Zellen.** 115  
Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M GlyR-TMD behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Die Behandlung mit GlyR-TMD (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zur signifikanten Reduktion des TER. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* p < 0,0001 gemäß Mann-Whitney-U-Test, n = 6.
- Abbildung 43 Cld1<sub>1-31</sub> hat keinen Einfluss auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco-2-Zellen.** 116  
Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld1<sub>1-31</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen (A). Die Behandlung mit Cld5<sub>53-81</sub> (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zu keiner signifikanten Änderung des TER (Mittelwert  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*). Die parazelluläre Permeation von FDS (B) und FD10 (C) wurde 48 h nach Behandlung der Zellen mit Cld5<sub>53-81</sub> gemessen und unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von der Kontrolle Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test, n = 6.
- Abbildung 44 Zusammenfassung der Wirkung aller untersuchten Peptide auf den TER von Caco2-Zellen.** 117  
Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld1<sub>1-31</sub>, Cld1<sub>53-81</sub>, Cld2<sub>53-81</sub>, Cld3<sub>140-159</sub>, Cld5<sub>53-81</sub> oder GlyR-TMD behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Cld1<sub>53-81</sub> und GlyR-TMD führten im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle zur signifikanten Reduktion des TER. Die übrigen Claudinpeptide veränderten den TER nicht signifikant. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* p < 0,0001 im Vergleich zur Kontrolle gemäß Mann-Whitney-U-Test, n  $\geq$  6.
- Abbildung 45 Während GST-CPE<sub>194-319</sub> nach 24 h zur signifikanten Reduktion des TER führt, hat GST-CPE<sub>116-319</sub> im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Wirkung auf den TER.** 118  
Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 10  $\mu$ g/ $\mu$ l GST-CPE<sub>116-319</sub> und GST-CPE<sub>194-319</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6 und 24 h danach gemessen. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* p < 0,0001 gemäß Mann-Whitney-U-Test, n = 6.
- Abbildung 46 Bei Ca<sup>2+</sup>-Depletion und anschließender Ca<sup>2+</sup>-Resupplementierung verhindert nur GST-CPE<sub>194-319</sub> aber nicht GST-CPE<sub>116-319</sub> den Wiederaufbau des TER der Caco-2-Zellen signifikant.** 119  
Caco-2-Zellen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz auf Zellkulturfiltern kultiviert. Anschließend wurde die TJ durch Kultivierung in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium geöffnet. Parallel zur Ca<sup>2+</sup>-Resupplementierung erfolgte die beidseitige Behandlung mit 10  $\mu$ g/ml GST-CPE<sub>194-319</sub>, GST-CPE<sub>116-319</sub> oder GST. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* p < 0,01 und \*\* p < 0,001 im Vergleich zur GST-Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*, n = 6.

- Abbildung 47 Basalolateral appliziertes GST-CPE<sub>194-319</sub> reduziert den TER von Ca-co-2-Zellen reversibel.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* apikal, basolateral oder beidseitig mit 10 µg/µl GST-CPE<sub>194-319</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Die basolateral oder beidseitig behandelten Caco-2-Zellen wiesen 24 und 48 h nach der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle einen signifikant reduzierten TER auf. Die apikale Behandlung der Zellen hatte keine signifikante Wirkung auf den TER. Nach 48-stündiger Inkubation wurde GST-CPE<sub>194-319</sub> durch einen Mediumwechsel entfernt (Pfeil). Nach weiteren 24 h unterschied sich der TER der basolateral oder beidseitig behandelten Zellen nicht mehr signifikant von der Kontrolle. Mittelwert ± SEM, \*  $p < 0,01$  und \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur GST-Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n = 6$ . **120**
- Abbildung 48 Vergleich der Aminosäuresequenz der 2. EZS der Mitglieder der Claudinfamilie.** Die Claudine wurden anhand von Sequenzähnlichkeiten in klassische und nicht-klassische Claudine eingeteilt. Angegeben sind die murinen Claudinsequenzen mit Ausnahme von Cld20, Cld21 und Cld24, von denen nur die humane Sequenz bekannt ist. Die beiden Isoformen von Cld10 und Cld18 unterscheiden sich nur hinsichtlich der Sequenz der 1. EZS. Für Cld23 sind zwei Sequenzen bekannt. Wiesen > 90 % bzw. > 70 % der Claudine an einer Position die gleiche AS auf, wurde die Konsensussequenz in großen bzw. kleinen Buchstaben angegeben (grün: hydrophobe Seitenkette, violett: hydrophile Seitenkette, blau: basische Seitenkette, magenta: saure Seitenkette, gelb: C, türkis: Y, schwarz: P (modifiziert nach [Krause, 08]). **134**
- Abbildung 49 Vergleich der Aminosäuren 53 - 81 von Mitgliedern der Claudinfamilie.** Die wirksamen Aminosäuren 53 - 81 des Cld1-Peptids sind denen der übrigen Claudine gegenübergestellt. Die Claudine wurden anhand von Sequenzähnlichkeiten in klassische und nicht-klassische Claudine eingeteilt. Angegeben sind die murinen Claudinsequenzen mit Ausnahme von Cld20, Cld21 und Cld24, von denen nur die humane Sequenz bekannt ist. Die Isoformen von Cld10 und Cld18 unterscheiden sich nur hinsichtlich ihrer 1. EZS. Für Cld23 sind zwei Sequenzen bekannt. Wiesen > 90 % bzw. > 70 % der Claudine an einer Position die gleiche AS auf, wurde die Konsensussequenz in großen bzw. kleinen Buchstaben angegeben (grün: hydrophobe Seitenkette, violett: hydrophile Seitenkette, blau: basische Seitenkette, magenta: saure Seitenkette, gelb: C, türkis: Y, schwarz: P). Der Sequenzvergleich verdeutlicht, dass kein anderes Claudin in diesen Bereichen dieselbe Sequenz wie Cld1 aufweist (modifiziert nach [Krause, 08]). **138**

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	<b>Änderung der elektrophysikalischen Eigenschaften von epithelialen oder endothelialen Zelllinien nach exogener Expression von Claudinen (↑ Anstieg, ↓ Abfall, ↔ unverändert, n.a.: nicht analysiert).</b>	<b>14</b>
<b>Tabelle 2</b>	<b>Veränderte Claudinexpression bei Tumorerkrankungen</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle 3</b>	<b>Liste der Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle 4</b>	<b>Liste der Chemikalien und Kulturmedien</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 5</b>	<b>Liste der Enzyme</b>	<b>39</b>
<b>Tabelle 6</b>	<b>Liste der Antikörper</b>	<b>39</b>
<b>Tabelle 7</b>	<b>Liste der Kits</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 8</b>	<b>Liste der Medien und Zusätze für Bakterien- und eukaryotische Zellkultur</b>	<b>41</b>
<b>Tabelle 9</b>	<b>Durch ortsspezifische Mutagenese hergestellte pEYFP-N1stopp•FLAG-Cld5-Konstrukte. Die eingeführten Punktmutationen sind fettgedruckt.</b>	<b>43</b>
<b>Tabelle 10</b>	<b>Reaktionsansätze für Mutagenese-PCR</b>	<b>44</b>
<b>Tabelle 11</b>	<b>Reaktionsansätze und Temperaturregime für Mutagenese-PCR</b>	<b>45</b>
<b>Tabelle 12</b>	<b>Primersequenzen, Reaktionsansatz und Inkubationsprotokoll der Kolonie-PCR</b>	<b>47</b>
<b>Tabelle 13</b>	<b>Sequenzierungsprimer</b>	<b>50</b>
<b>Tabelle 14</b>	<b>Inkubationsprotokoll der Sequenzierungs-PCR</b>	<b>50</b>
<b>Tabelle 15</b>	<b>Primärantikörper und deren Verdünnungen für Immunfluoreszenzfärbungen</b>	<b>56</b>
<b>Tabelle 16</b>	<b>Sekundärantikörper und deren Verdünnungen für Immunfluoreszenzfärbungen</b>	<b>57</b>
<b>Tabelle 17</b>	<b>Parameter für die Detektion von DAPI, Cy3 und 488 und DAPI an konfokalen Mikroskopen</b>	<b>58</b>
<b>Tabelle 18</b>	<b>Liste der Claudinpeptide</b>	<b>65</b>
<b>Tabelle 19</b>	<b>Puffer für <i>Western Blots</i></b>	<b>69</b>
<b>Tabelle 20</b>	<b>Liste der Antikörper für die immunologische Detektion von Proteinbanden auf Membranen</b>	<b>70</b>
<b>Tabelle 21</b>	<b>Zusammenfassung der Wirkungen der stabil exprimierten FLAG-Cld5-Proteine auf die parazelluläre Dichtigkeit von MDCK-II-Zellen</b>	<b>133</b>
<b>Tabelle S22</b>	<b>TER-Werte der FLAG-Cld5 stabil exprimierenden MDCK-II-Zellen</b>	<b>170</b>
<b>Tabelle S23</b>	<b><math>P_{coeff}</math> (FDS) der FLAG-Cld5 exprimierenden MDCK-II-Zellen</b>	<b>170</b>
<b>Tabelle S24</b>	<b><math>P_{coeff}</math> (FD10) der FLAG-Cld5 exprimierenden MDCK-II-Zellen</b>	<b>170</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Å	Angström
A6	Nierenepithelzelllinie aus dem Krallenfrosch
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
bEND3	Gehirndothelzelllinie aus der Maus
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
Caco-2	humane Kolonkarzinom Zelllinie
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CFP	engl. <i>cyan fluorescent protein</i>
CHO	engl. <i>Chinese hamster ovari</i>
Cld	Claudin
C <sub>m</sub>	Membrankapazität
CM-Filter	Zellkulturfilter mit Matrix aus hydrophilem Polytetrafluoroethylen
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosine-5'-triphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleid acid</i> )
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
ECIS	engl. <i>Electric cell-substrat Impedance Sensing</i>

<b>EGTA</b>	Ethylenglycol-bis(Oxyethylenitril)-Tetraessigsäure (engl. <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> )
<b>Eph4</b>	murine Brustdrüsenepithelzellen
<b>EZS</b>	extrazelluläre Schleife
<b>FCS</b>	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i> )
<b>FD10</b>	10 kDa Fluoresceinisothiocyanat-Dextran
<b>FDS</b>	Fluoresceindinatriumsalz
<b>FHHNC</b>	engl. <i>familia hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis</i>
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FRET</b>	engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>
<b>G418</b>	Geneticinsulfat
<b>GlyR</b>	Glycinrezeptor
<b>GUK</b>	katalytisch inaktive Guanylatkinase
<b>HBSS</b>	engl. <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
<b>hCMEC/D3</b>	humane Gehirnapillarendothelzelllinie
<b>HEK-293</b>	humane embryonale Nierenzelllinie (engl. <i>human embryonic kidney</i> )
<b>HRP</b>	engl. <i>horse radish peroxidase</i>
<b>HUVEC</b>	engl. <i>human umbilical vein endothelial cells</i>
<b>IB3.1</b>	humane Lungenepithelzelllinie
<b>JAM</b>	engl. <i>junctional adhesion molecule</i>
<b>kb</b>	Kilobasenpaare
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LLC-PK1</b>	Zelllinie aus dem proximalen Tubulusepithel der Schweineniere
<b>MAGUK</b>	engl. <i>membrane-associated guanylate kinase</i>
<b>MDCK</b>	Madin-Darby <i>canine kidney</i> Zelllinie, Epithelzellen aus der Hundeniere
<b>MDCK-C11</b>	MDCK Zelllinie mit geringem TER (Klon 11)
<b>MDCK-C7</b>	MDCK Zelllinie mit hohem TER (Klon 7)
<b>MDCK-I</b>	MDCK Zelllinie mit hohem TER
<b>MDCK-II</b>	MDCK Zelllinie mit geringem TER
<b>MDCK-II T23</b>	MDCK Zelllinie mit geringem TER, die zusätzlich mutiertes $\beta$ -Cathenin exprimiert
<b>MEM</b>	engl. <i>Minimum Essential Medium</i>

<b>MW</b>	Molekulargewicht (engl. <i>molecular weight</i> )
<b>NIH/3T3</b>	Zelllinie aus embryonalen Mausfibroblasten
<b>NRC</b>	Gallengangepithelzelllinie aus der Ratte
<b>N-Terminus</b>	Amino-Terminus
<b>Occ</b>	<b>Occludin</b>
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PBS +/-</b>	PBS mit $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$
<b>PCF-Filter</b>	Zellkulturfilter mit Matrix aus Polycarbonat
<b><math>P_{\text{coeff}}</math></b>	parazellulärer Permeationskoeffizient
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PDZ</b>	Diese Abkürzung ergibt sich aus den ersten Buchstaben der drei Proteine, bei denen die PDZ-Domäne zuerst beschrieben wurde: <i>post synaptic density</i> Protein, <i>Drosophila disc large tumor suppressor</i> und <b>ZO-1</b> .
<b>PLC</b>	<b>Phospholipase C</b>
<b>PVDF</b>	<b>Polyvinylidenfluorid</b>
<b><math>R_b</math></b>	engl. <i>junctional resistance</i> , bei ECIS-Messungen der Teil des parazellulären Widerstands, der durch den <i>junctional complex</i> bedingt ist
<b>RLE</b>	engl. <i>rat lung endothelial</i> (Endothelzellen aus der Lunge einer Ratte)
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )
<b>RT</b>	<b>Raumtemperatur</b>
<b>SDS</b>	Natrium-Dodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwertes (engl. <i>standard error of the mean</i> )
<b>SH3</b>	engl. <i>Src-homology 3</i>
<b>siRNA</b>	engl. <i>small interfering RNA</i>
<b>SK-CO15</b>	humane Kolonepithelzelllinie
<b>SKOV3</b>	humane Ovarkarzinomzelllinie
<b>S-MEM</b>	engl. <i>Minimum Essential Medium Eagle Spinner Modification</i>
<b>src</b>	Gen, das für eine protoonkogene Tyrosinkinase kodiert
<b>T84</b>	humane Kolonadenokarzinomzelllinie
<b>TBST</b>	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20 (engl. <i>tris-buffered saline Tween-20</i> )
<b>TDM</b>	<b>Transmembrandomäne</b>
<b>TEMED</b>	<b>Tetramethylethylendiamin</b>



<b>TER</b>	transepithelialer elektrischer Widerstand (engl. <i>transepithelia electrical resistance</i> )
<b>TJ</b>	engl. <i>tight junction</i>
<b>TR-BBB</b>	Gehirnkapillarendothelzelllinie aus der Ratte
<b>Tris</b>	<b>Tris</b> (hydroxymethyl)aminomethan
<b>üN</b>	über <b>N</b> acht
<b>UV</b>	ultraviolett
<b>wt</b>	<b>W</b> ildtyp
<b>YFP</b>	engl. <i>yellow fluorescent protein</i>
<b>ZO</b>	<b>Z</b> onula <b>o</b> ccludens
$\alpha$	bei ECIS-Messungen der Teil des parazellulären Widerstands, der aus der Adhäsion der Zellen an das Substrat resultiert
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Anregungswellenlänge

### Abkürzungen von Nukleotiden

A	<b>A</b> denin
C	<b>C</b> ytosin
G	<b>G</b> uanin
T	<b>T</b> hymिन

### Abkürzungen von Aminosäuren

A/Ala	Alanin
C/Cys	Cystein
D/Asp	Asparaginsäure
E/Glu	Glutaminsäure
F/Phe	Phenylalanin
G/Gly	Glycin
H/His	Histidin
I/Ile	Isoleucin
K/Lys	Lysin
L/Leu	Leucin

M/Met	Methionin
N/Asp	Asparagin
P/Pro	Prolin
Q/Gln	Glutamin
R/Arg	Arginin
S/Ser	Serin
T/Thr	Threonin
V/Val	Valin
W/Trp	Tryptophan
X	beliebige Aminosäure
Y/Tyr	Tyrosin

## Zusammenfassung

In multizellulären Organismen bilden Epithel- und Endothelzellen die äußere Begrenzung innerer und äußerer Körperoberflächen bzw. kleiden die Blutgefäße aus. So schaffen sie abgegrenzte Organkompartimente mit individuellen, der jeweiligen Funktion angepassten Bedingungen. Dazu muss die freie, parazelluläre Diffusion von Stoffen eingeschränkt werden. Die Abdichtung des parazellulären Spalts erfolgt durch *tight junctions* (TJ). Diese stellen ein elektronenmikroskopisch sichtbares Netzwerk aus intermembranösen Strängen im apikalen Bereich der lateralen Plasmamembran von Epithel- und Endothelzellen dar. Claudine (Cld) bilden das strukturelle Rückgrat der TJ.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass einzelne Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife (2. EZS) eines Claudins für die parazelluläre Dichtigkeit einer epithelialen Zelllinie essentiell sind. Da endogene TJ-Stränge fast ausschließlich aus mindestens zwei verschiedenen Claudinen aufgebaut sind, wurde die Wirkung von Aminosäuresubstitutionen in der 2. EZS von Cld5 auf die parazelluläre Dichtigkeit in einer claudinheterogenen Umgebung analysiert. Dafür wurden verschiedene Cld5-Mutanten stabil in MDCK-II-Zellen exprimiert. Die Aminosäuresubstitutionen in der 2. EZS von Cld5 führten nicht nur zum Verlust der durch Cld5<sub>wt</sub> bedingten parazellulären Abdichtung, sondern darüber hinaus zu einer geringeren parazellulären Dichtigkeit im Vergleich zur Vektorkontrolle.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde mit einem Peptid, dessen Sequenz der C-terminalen Hälfte der 1. EZS von Cld1 entsprach (Cld1<sub>53-81</sub>), eine reversible Öffnung der TJ von epithelialen Zelllinien erzielt. Peptide, die den entsprechenden Sequenzen der 1. EZS von Cld2 und Cld5 nachempfunden waren, und Peptide, die anderen Strukturbereichen von Claudinen entsprachen, zeigten dagegen keine Wirkung auf die parazelluläre Dichtigkeit der behandelten Zellen. Mit dem N-terminal verkürzten *Clostridium perfringens* Enterotoxin-Fragment CPE<sub>194-319</sub> wurde ebenfalls eine Reduktion der parazellulären Dichtigkeit von Epithelzellen erzielt.

Insgesamt tragen die Untersuchungen dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der durch Claudine vermittelten Abdichtung des parazellulären Spalts bei. Darüber hinaus bieten Cld1<sub>53-81</sub> und CPE<sub>194-319</sub> neue Perspektiven für eine gezielte therapeutische Öffnung der TJ, um beispielsweise die Wirkstoffzufuhr ins Gehirn zu verbessern.

## Summary

Epithelial and endothelial cells form the external lining of outer and inner body surfaces and blood vessels of multicellular organisms. Thus, they create separate compartments each exhibiting an environment optimally adjusted to their respective function. To build up such compartments epithelial and endothelial cells have to restrict the paracellular diffusion of substances. The paracellular cleft is sealed by tight junctions (TJ). In electron microscopical images TJs appear as a network of intermembranous strands in the apical region of the lateral cell membrane of epithelial and endothelial cells. Claudins (Cld) form the structural backbone of TJs.

The present study provided evidence for the first time that single amino acids of the second extracellular loop (ECL) of a claudin are essential for the paracellular tightness of epithelial cells. Because endogenous TJ stands are almost exclusively composed of at least two different claudins, the effect of single amino acid substitutions of the second ECL of Cld5 were studied in cells expressing various other endogenous claudins except Cld5. Point mutants of Cld5 were stably expressed in MDCK-II cells. While the expression of Cld5<sub>wt</sub> caused increased paracellular tightness, this effect was completely abolished by the Cld5 point mutants. Furthermore, the mutants even decreased the paracellular permeation of certain substances compared with the vector control.

Further findings of the present study demonstrated that a peptide corresponding to the C-terminal half of the first ECL of Cld1 is capable of opening the TJ in a reversible manner. Peptides based on the amino acid sequence of the first ECL of Cld2, Cld5 or other structural domains of claudins failed to show any effect on the paracellular tightness of epithelial cells. However, using an N-terminal fragment of clostridium perfringens enterotoxin (CPE<sub>194-319</sub>) a reduction of the paracellular tightness of epithelial cells was demonstrated.

Taken together, the findings of the present study contribute to a better understanding of the sealing of the paracellular cleft by claudins. Furthermore, Cld1<sub>53-81</sub> und CPE<sub>194-319</sub> open new perspectives for a targeted therapeutic opening of the TJs suited for enhancing the transport of active substances into diseased tissue.

# 1 Einleitung

## 1.1 Epithel- und Endothelzellen

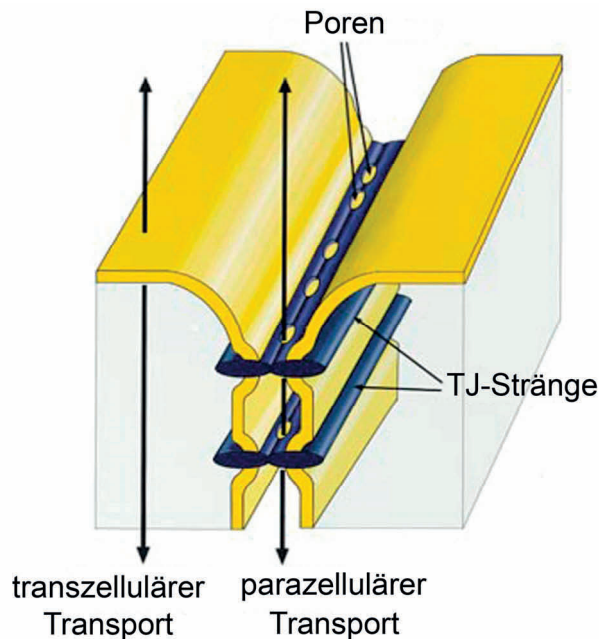
Im Laufe der Evolution erfolgte die Entwicklung von Einzellern zu Vielzellern. Die damit verbundene Spezialisierung von Zell- und Gewebeverbänden konnte nur durch die Ausbildung von Epithel- und Endothelzellen erfolgen. Diese beiden Zelltypen bilden die äußere Abgrenzung innerer und äußerer Körperoberflächen. Die Endothelzellen stellen eine Sonderform der Epithelzellen dar. Sie kleiden die innere Oberfläche der Blutgefäße aus.

Die wichtigste Funktion der Epithel- und Endothelzellen ist die Ausbildung einer physikalischen Barriere, die das innere Milieu von Organen gegenüber der Umgebung abgrenzt. Zudem regulieren beide Zelltypen den Transport von Wasser und darin gelösten Stoffen. Abhängig von ihrer Lokalisation haben Epithelien weitere Funktionen. Im Darm dienen sie der Resorption von Nahrungsbestandteilen, in der Lunge dem Abtransport von Fremdstoffen, der durch kleine Flimmerhärchen vermittelt wird [Macklin, 26; Smyth, 68; Reid, 76]. Das mehrschichtige Epithel der Haut bildet einen mechanischen Schutz gegenüber äußeren Einwirkungen wie Licht, Wärme und ultraviolette Strahlung [THOMSON, 55]. Die Sekretionsfunktion von Drüsenepithelzellen, die Sinnesfunktion von in die Epidermis eingelagerten Mechanorezeptoren und die Stoffwechselfunktion von Keratinozyten stellen weitere Aufgaben von Epithelzellen dar [Hume, 27; Waterston, 33; WEINTRAUB, 65].

Bei der Anwendung oder Einnahme eines Arzneimittels stellen Epithel- und Endothelzellen die Stelle des ersten Kontakts zwischen Wirkstoff und Körper dar. Damit sind sie ein attraktives Ziel für pharmakologische Beeinflussungen. Gleichzeitig beschränken Endothelzellen die Zugänglichkeit der Gewebe für zahlreiche Wirkstoffe. So stellt beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke (BHS) für über 90 % der potentiell geeigneten Wirkstoffe zur Behandlung von Erkrankungen des Gehirns eine unüberwindbare Barriere dar [Kondoh, 06].

## 1.2 Stofftransport und *junctional complex*

Der epitheliale bzw. endotheliale Transport von Molekülen kann trans- oder parazellulär erfolgen (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Stofftransport durch epitheliale und endotheliale Zellen** (modifiziert nach [Tsukita, 00]).

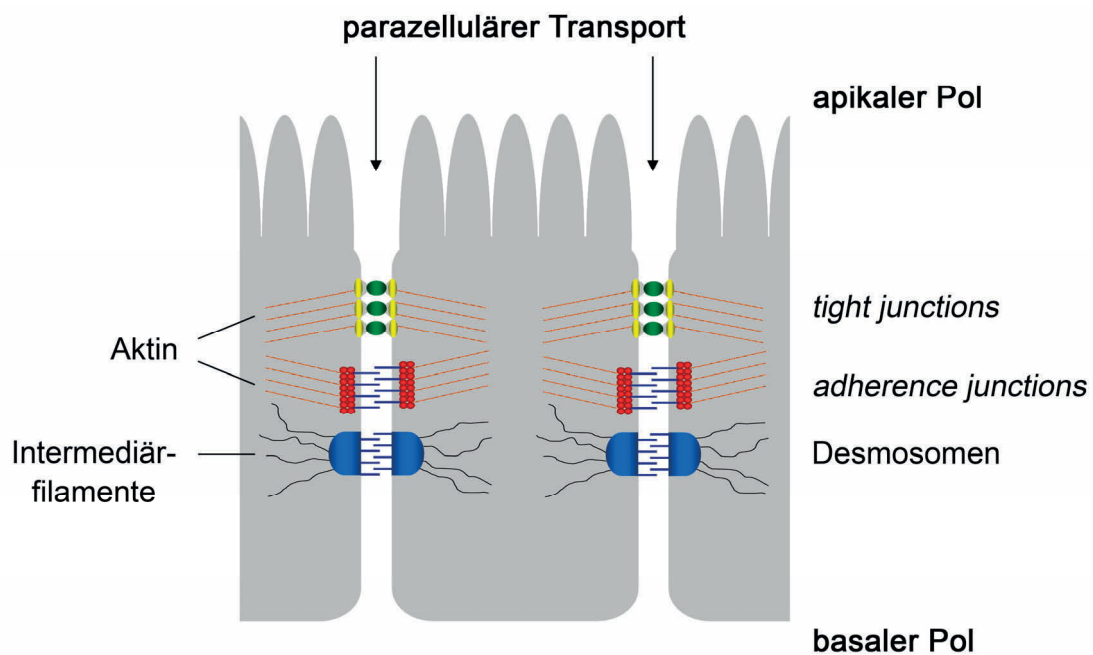
Der transzelluläre Stofftransport wird durch Kanäle oder Transporter katalysiert oder beruht auf Endo- und Exozytose. Diese Transportvorgänge sind für das zu transportierende Molekül hochspezifisch.

Der parazelluläre Transport erfolgt als Diffusion, d.h. als passiver Transport entlang eines chemischen oder elektrochemischen Gradienten. Ohne physiologische Barriere würde sich bei freier Diffusion stets ein Konzentrationsgleichgewicht einstellen. Um diesen Ausgleich zu verhindern und abgegrenzte Reaktionsräume zu schaffen, haben Epithel- und Endothelzellen Strukturen entwickelt, die die parazelluläre freie Diffusion von Stoffen teilweise deutlich einschränken.

Die parazelluläre Dichtigkeit von Epithel- und Endothelzellverbänden wird durch die Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) quantifiziert [Powell, 81]. Dabei wurde beobachtet, dass sich die TER-Werte dichter und undichter Epithelzell-

linien um den Faktor  $10^5$  unterscheiden [Van Itallie, 06a]. Auch *in vivo* wurden deutliche Unterschiede beschrieben. So wiesen beispielsweise die Epithelzellen im proximalen Tubulus der Niere einen TER von  $10 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , die Epithelzellen der Harnblase hingegen einen TER von  $10.000 \Omega \cdot \text{cm}^2$  auf [Cereijido, 00; Staehelin, 73].

Für die parazelluläre Dichtigkeit von Zellverbänden sind Strukturen verantwortlich, die als *junctional complex* bezeichnet werden. Diese werden in *tight junctions* (TJ, auch *zonulae occludentes*), *adherens junctions* und Desmosomen unterteilt (Abbildung 2).



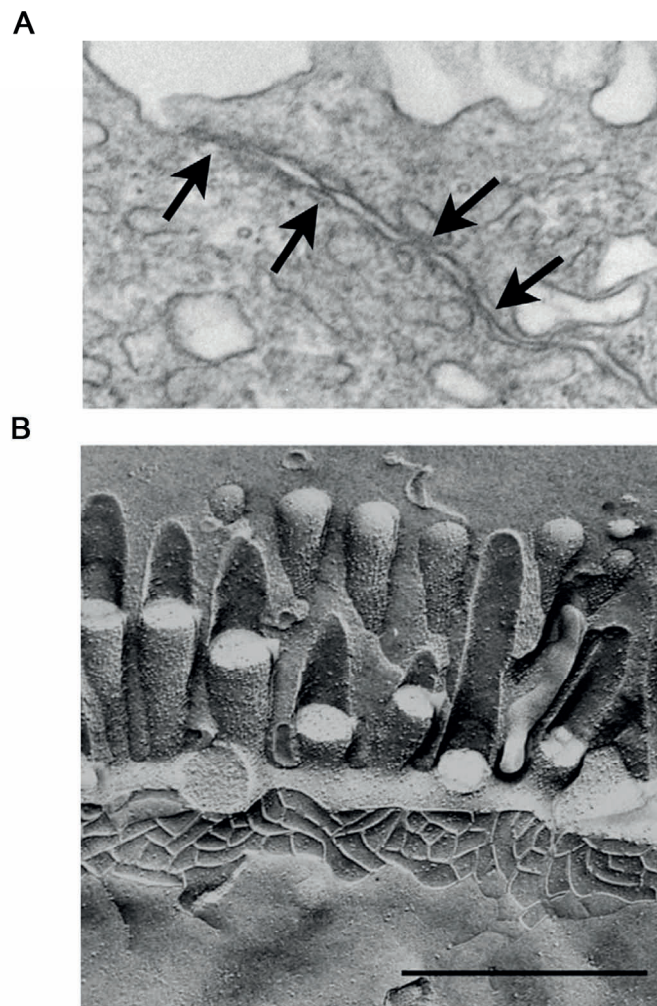
**Abbildung 2: Aufbau des *junctional complex* am Beispiel einer Epithelzelle** (modifiziert nach [Johnson, 05a]).

Neben ihren parazellulären Barriereeigenschaften sind diese Strukturen auch für die Polarisierung der Zellen verantwortlich, da sie die freie Diffusion von Lipiden und Proteinen in der Plasmamembran einschränken (*fence function*). Dadurch entstehen innerhalb der Plasmamembran ein apikaler und ein basolateraler Bereich, die deutlich von einander abgegrenzt sind und sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus Lipiden und Proteinen unterscheiden [Balda, 98; Tsukita, 01; van Meer, 86; Cereijido, 98].

### **1.2.1 *Tight junctions***

*Tight junctions* (TJ) stellen in der lateralen Plasmamembran die am weitesten apikal gelegene Struktur des *junctional complex* dar [FARQUHAR, 63]; Abbildung 2). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass sich die Plasmamembranen benachbarter Zellen in diesem Bereich bis auf wenige Mikrometer nähern und als Serie von engen Zell-Zell-Kontakten erscheinen (*kissing points*) (Abbildung 3A). Gefrierbruchstudien des gleichen Bereichs zeigen die TJ als kontinuierliches Netzwerk aus parallelen Strängen transmembranaler Proteine [Staehein, 73; Staehein, 74]; Abbildung 3B).





**Abbildung 3: Ultradünne elektronenmikroskopische Aufnahme der TJ-Region primärer humaner Retinaepithelzellen (A).** Die Pfeile zeigen Bereiche, in denen sich die Plasmamembranen der beiden Zellen bis auf wenige Mikrometer nähern (*kissing points*) [Rajasekaran, 08]. **Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahme der von Claudinen gebildeten TJ-Stränge in einer Darmepithelzelle (B).** Die apikal lokalisierten Mikrovilli (MV) ragen ins Darmlumen. Die TJ erscheinen als kontinuierliches Netzwerk. Maßstab: 0,5 µm [Achler, 89].

Dabei sind die Stränge einer Zelle mit den Strängen der benachbarten Zelle assoziiert [Furuse, 06]. Wird die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran von Epithelzellen zunächst durch Gefrierbruchtechniken getrennt und anschließend elektronenmikroskopisch analysiert, werden sowohl eine Assoziation der TJ-Stränge mit der protoplasmatischen Hälfte als auch äquivalente Vertiefungen in der korrespondierenden exoplasmatischen Hälfte beobachtet [Staehein, 73]. In Endothelzellen hingegen findet man vor allem eine

Assoziation der TJ-Stränge mit der exoplasmatischen Hälfte der Plasmamembran vor [Simionescu, 76; Muhleisen, 89].

Die TJ sind der Bereich des *junctional complex*, der die parazelluläre Dichtigkeit von Epithel- und Endothelzellen bestimmt [Cereijido, 00]. Zunächst wurde angenommen, dass der TER unmittelbar aus der Anzahl und Komplexität der TJ-Stränge resultiert [Claude, 73]. Dieser direkte Zusammenhang konnte jedoch nicht für alle Zelltypen bestätigt werden. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass TJ auch Poren enthalten, die zwischen offener und geschlossener Konformation wechseln können [Florey, 66; Claude, 78]. Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass die Anzahl der TJ-Stränge proportional zum Logarithmus des TER ist. Tatsächlich erfüllen TJ nicht nur Barrierefunktionen, sondern dienen auch dem parazellulären Stofftransport [Powell, 81]. Die ersten Hinweise auf die Bedeutung der TJ für den parazellulären Stofftransport lieferten elektrophysiologischen Messungen, in denen gezeigt wurde, dass die Poren im Bereich der TJ einen Radius von 3 - 4 nm aufweisen, wohingegen andere Poren in der Plasmamembran einen Radius von 0,4 nm besitzen [SIDEL, 57; LINDEMANN, 62].

Die TJ setzen sich aus über 40 verschiedenen Proteinen zusammen, die sich in transmembranale und periphere TJ-Proteine einteilen lassen. Bei den transmembranalen TJ-Proteinen handelt es sich um transmembranale Proteine, deren extrazelluläre Schleifen miteinander interagieren und so den parazellulären Spalt verschließen oder größen- und ladungsselektive Poren bilden. Die Funktionen der peripheren TJ-Proteine sind vielfältiger. Einige periphere TJ-Proteine stabilisieren die TJ, indem sie die Transmembranproteine organisieren und mit dem Zytoskelett verankern. Andere Proteine sind an der Signaltransduktion beteiligt, tragen zur Ausbildung der Zellpolarität bei oder dienen dem Transport von Vesikeln [Gonzalez-Mariscal, 03; Schneeberger, 04].

### **1.2.2 Adherence junctions und Desmosomen**

Während TJ in Epithelzellverbänden den größten Teil des *junctional complex* darstellen, machen *adherence junctions* den größten Teil des *junctional complex* von Endothelzellverbänden aus [Mehta, 06; Balkovetz, 06]. Im Bereich der *adherence junctions* und Desmosomen weisen die lateral apikalen Membranabschnitte zweier benachbarter Zellen bereits einen größeren räumlichen Abstand zueinander auf. Diese Strukturen dienen folglich weniger der Abdichtung des parazellulären Spalts als vielmehr der mechanischen

Verbindung der Zellen und ihrer Zytoskelette. Auf Grund des komplexen Aufbaus des *junctional complex* wird im Folgenden nur auf die für diese Arbeit relevanten TJ-Proteine eingegangen.

### 1.3 Proteine der *tight junctions*

In den vergangenen 20 Jahren wurden über 40 TJ-relevante Proteine entdeckt. Die im Folgenden beschriebenen Proteine gehören zu den transmembranalen TJ-Proteinen, die mit ihren extrazellulären Domänen den interzellulären Raum durchspannen und damit die parazelluläre Barriere aufbauen oder zu den peripher assoziierten Gerüstproteinen, die für die korrekte Lokalisation der transmembranalen Proteine sorgen und sie mit dem Zytoskelett verankern.

#### 1.3.1 Periphere *tight junction*-Proteine

Das erste TJ-Protein wurde 1986 entdeckt. Es hat eine molekulare Masse von 220 kDa und wurde nach seiner Lokalisation und Funktion *Zonula Occludens-1* (ZO-1) genannt [Stevenson, 86]. Fünf bzw. sieben Jahre später wurden mit ZO-2 (160 kDa) und ZO-3 (130 kDa) zwei weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie entdeckt [Gumbiner, 91; Balda, 93]. Die ZO-Proteine gehören zu den Gerüstproteinen, die das Rückgrat der TJ ausbilden. Für alle drei Vertreter wurde mittels Elektronenmikroskopie eine ausnahmslose Lokalisation an der zytoplasmatischen Oberfläche der TJ in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran nachgewiesen [Turksen, 04]. Die ZO-Proteine interagieren mit zahlreichen anderen TJ-Proteinen und sind damit an deren korrekter Lokalisation beteiligt. Alle drei ZO-Proteine besitzen, beginnend vom N-Terminus, drei PDZ-Domänen, eine *Src oncogene homology region 3* (SH3) und eine katalytisch inaktive Guanylatkinase (GUK) homologe Region [Woods, 93; Haskins, 98; Itoh, 93; Jesaitis, 94; Willott, 93]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die ZO-Proteine zur Familie der **membrane-associated guanylate kinases** (MAGUK) gehören [Anderson, 95; Kim, 95; Woods, 93]. ZO-Proteine weisen zudem eine saure und eine prolinreiche Region auf. Diese sind bei ZO-1 und ZO-2 am C-Terminus lokalisiert, bei ZO-3 hingegen zwischen der PDZ2 und PDZ3. Die prolinreiche Region von ZO-1 kann an Aktin binden und dient daher der Verbindung der TJ mit dem Zytoskelett [Fanning, 98]. Die C-terminalen Reste der PDZ Domänen sind durch

Ausbildung einer hydrophoben Vertiefung in der Lage, an das ebenfalls C-terminal lokalisierte Motiv T/SXV (X: beliebige Aminosäure) zu binden [Fanning, 99]. Über diese Interaktionen wird sowohl eine Heterodimerisierung zwischen der PDZ2 von ZO-1 mit der PDZ2 von ZO-2 und ZO-3 sowie eine Homodimerisierung zwischen zwei PDZ2 von ZO-1 vermittelt [Wittchen, 99; Utepbergenov, 06]. Für die PDZ1 der ZO-Proteine wurden direkte Bindungen an die transmembranalen TJ-Proteine Occludin, *junctional adhesion molecules* (JAM), *coxsackie and adenovirus receptor* (CAR) sowie den C-Terminus von Claudinen demonstriert [Itoh, 99; Ebnet, 08]. Trotz dieser zahlreichen Interaktionspartner hat der Verlust von ZO-1 lediglich eine verzögerte Ausbildung der TJ zur Folge, die sich jedoch funktionell nicht von den Wildtyp-TJ unterscheiden [McNeil, 06; Rapoport, 80]. Auch hinsichtlich des TER wurde nach einem ZO-1 *knock out* in Eph4 Zellen kein Unterschied zu den nativen Eph4 Zellen gefunden [Rapoport, 80]. Erst der Verlust von ZO-1 und ZO-2 führte in den bereits ZO-3-freien Eph4 Zellen zum Abfall des TER [Umeda, 06].

### **1.3.2 Transmembranale *tight junction*-Proteine**

Claudine wurden 1998 erstmalig beschrieben [Furuse, 98a]. Sie bilden den Hauptbestandteil der TJ-Stränge und regulieren die parazelluläre Dichtigkeit [Simon, 99]. Gegenwärtig umfasst diese Proteinfamilie 24 Mitglieder [Angelow, 08]. Sie gehören zusammen mit Occludin, JAM und Trizellulin zur Gruppe der transmembranalen TJ-Proteine [Furuse, 98a; Ikenouchi, 05; Coyne, 05; Furuse, 93; Bazzoni, 03]. Auf Grund der zentralen Rolle der Claudine in dieser Arbeit, werden sie im folgenden Kapitel gesondert beschrieben.

#### **1.3.2.1 Occludin**

Das etwa 60 kDa große Occludin wurde 1993 als erstes transmembranales TJ-Protein entdeckt [Furuse, 93; Ando-Akatsuka, 96]. Occludin besitzt einen 149 Aminosäuren langen intrazellulären N-Terminus, vier transmembranale Domänen, zwei extrazelluläre Schleifen (EZS, erste EZS: 45 Aminosäuren, zweite EZS: 44 Aminosäuren) und einen 254 Aminosäuren umfassenden intrazellulären C-Terminus. Über den C-Terminus wird eine Interaktion mit ZO-1 vermittelt [Furuse, 94]. Die Überexpression von Occludin in epithelialen MDCK-II-Zellen führte zur Erhöhung des TER, jedoch überraschenderweise

auch zur Erhöhung der parazellulären Permeation von 4 kDa-FITC-Dextran [McCarthy, 96; Balda, 96]. Außerdem war die Anzahl der TJ-Stränge erhöht [McCarthy, 96]. Nach Transfektion von Occludin in TJ-freie Insektenzellen wurden keine konventionellen TJ-Stränge ausgebildet, sondern lediglich Anreicherungen von Occludin in den Zell-Zell-Kontakten occludinexprimierender Zellen beobachtet [Furuse, 96]. Die Zerstörung beider Occludin-Allele in embryonalen Stammzellen beeinträchtigte weder die Ausbildung der TJ oder des TER noch die Polarisierung der Zellen [Saitou, 98]. Ebenso waren Ausbildung und Funktion der TJ bei Occludin *knock out* Mäusen nicht gestört. Dennoch wiesen die Mäuse in verschiedenen Organen zahlreiche pathogene Veränderungen auf. Sie zeigten beispielsweise chronische Entzündungsreaktionen, eine Hyperplasie des Magenepithels, eine Hodenatropie, eine Ausdünnung kompakter Knochen sowie Kalziumablagerungen im Gehirn [Saitou, 00]. Diese Befunde deuteten darauf hin, dass die Funktion von Occludin über die Ausbildung von TJ hinausreicht. Die genaue Bedeutung von Occludin ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch ungeklärt. Obwohl Occludin selbst keine TJ-Stränge ausbilden kann, wird es dennoch in bestehende Stränge eingebaut und ist am Aufbau des parazellulären Widerstands beteiligt. Da die beiden extrazellulären Schleifen von Occludin zwar reich an G und Y sind, jedoch nur wenige geladene Aminosäuren enthalten, ist zumindest kein direkter Einfluss von Occludin auf die Ausbildung ladungsselektiver Ionenporen anzunehmen [Furuse, 93; Schneeberger, 04].

#### 1.3.2.2 *Junctional adhesion molecules*

Die JAM sind eine Gruppe transmembranaler TJ-Proteine, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Sie haben ein Molekulargewicht von etwa 32 kDa und durchspannen die Plasmamembran mit einer Transmembrandomäne [Martin-Padura, 98]. Sie besitzen zwei immunglobulinähnliche extrazelluläre Schleifen und eine C-terminale intrazelluläre Domäne. Ihre Expression ist nicht auf Epithel- und Endothelzellen beschränkt, sondern sie wurden beispielsweise auch in TJ-freien Leukozyten nachgewiesen [D'Atri, 02]. JAM werden anhand ihrer Sequenzähnlichkeiten in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe umfasst JAM-1, -2 und -3. Diese drei Isoformen besitzen ein intrazelluläres Klasse II PDZ-Bindemotiv und können direkt mit ZO-1 interagieren [D'Atri, 02; Ebnet, 00]. Die andere Gruppe umfasst JAM mit einem intrazellulären Klasse I PDZ-Bindemotiv. Dazu gehören das *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM), CAR und JAM4. Die

genaue Funktion der JAM in den TJ ist gegenwärtig noch unklar. Für JAM-1 wurden neben intrazellulären Bindungspartnern auch homo- und heterophile Wechselwirkungen mit seiner extrazellulären Domäne gezeigt [Bazzoni, 00; Kostrewa, 01]. Daher ist JAM-1 an verschiedenen Funktionen beteiligt, beispielsweise an der Regulation der Barrierefunktion, dem Aufbau der TJ in epithelialen und endothelialen Zellen, der Leukozytentransmigration, der Angiogenese sowie der Plättchenaggregation [Martin-Padura, 98; Liu, 00; Mandell, 04; Laukoetter, 07; Naik, 03]. Außerdem dient es als Virusrezeptor [Forrest, 03; Barton, 01]. Die Expression von JAM in TJ-freien L-Fibroblasten führte nicht zur *de novo* Ausbildung von TJ-Strängen [Itoh, 01]. Für CAR wurde ein Einfluss auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen nachgewiesen. Die Expression von CAR in MDCK-I-Zellen führte zur Erhöhung des TER und nach Expression in CHO (*Chinese hamster ovary*) Zellen (zur Reduktion der parazellulären Permeation von 40 kDa-FITC-Dextran [Cohen, 01]. Auch in humanen Lungenepithelzellen wurde gezeigt, dass die Überexpression von CAR zu einem signifikant höheren TER führt [Walters, 02]. Die Gabe eines CAR-Antikörpers hingegen führte zur Störung der TJ Ausbildung und zu einem signifikant reduzierten TER [Walters, 02].

### 1.3.2.3 Trizellulin

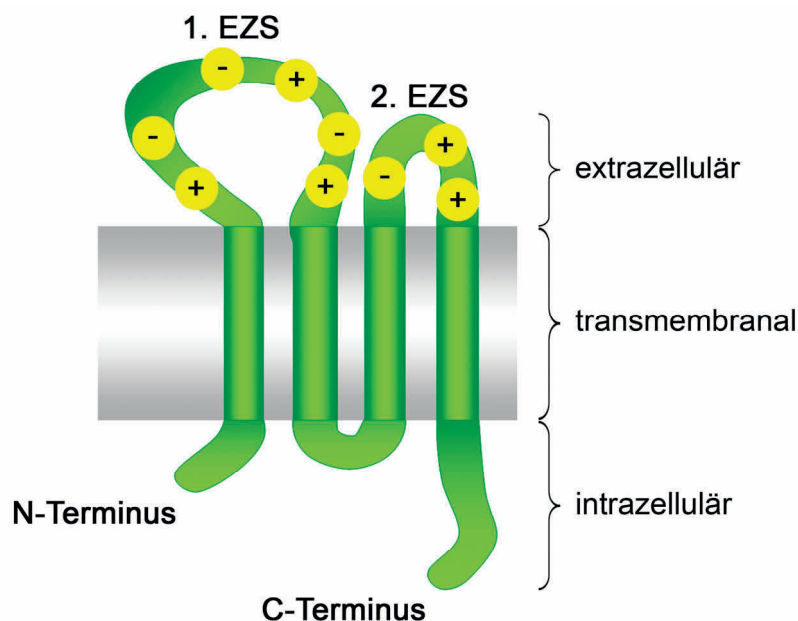
Der zuletzt entdeckte Vertreter der transmembranalen TJ-Proteine ist Trizellulin. Dieses 63,6 kDa Protein ist an trizellulären Kontakten (Stellen, an denen drei Epithelzellen aufeinander treffen) lokalisiert [Ikenouchi, 05]. Trizellulin besitzt vier transmembranale Domänen und einen intrazellulären C-Terminus, der zu 32 % mit dem von Occludin übereinstimmt. Die Reduktion der Expression von Trizellulin in EphH4 Zellen (murine Brustdrüsenepithelzelllinie) durch RNA-Interferenz führte zu einer Reduktion von Occludin in den TJ sowie zur Abnahme des TER und der parazellulären Dichtigkeit gegenüber 4 kDa-FITC-Dextran [Ikenouchi, 05]. Die zusätzliche Expression von Trizellulin in Cld1-exprimierenden L-Fibroblasten führte zur stärkeren Quervernetzung der gebildeten TJ-Stränge [Ikenouchi, 08]. In Eph4-Zellen, in denen die Expression von ZO-1 und ZO-2 durch einen *knock out* bzw. *knock down* verhindert bzw. stark reduziert wurde, war Trizellulin nicht länger in den TJ lokalisiert [Umeda, 06; Ikenouchi, 07]. Der *knock down* von Occludin mittels siRNA führte in MDCK-II-Zellen zum Verlust der Trizellulinanreicherung an den trizellulären Kontakten bei gleichzeitiger Anreicherung an bizellulären Kontaktstel-

len [Ikenouchi, 08]. Obwohl Trizellulin ubiquitär in Epithelzellen exprimiert wird, wurde bisher nur Taubheit als Folge einer Trizellulinmutation beschrieben [Riazuddin, 06].

### 1.3.3 Claudine

Bei der Suche nach dem strukturellen Rückgrat der TJ-Stränge (Abbildung 3B) wurden 1998 in einer angereicherten TJ-Fraktion der Hühnerleber zwei 22 kDa Proteine entdeckt, die als Cld1 und Cld2 bezeichnet wurden [Furuse, 98a]. Seitdem wurden 22 weitere Vertreter der Claudinfamilie (18 bis 27 kDa) in Säugetieren gefunden [Forster, 08].

Alle Claudine besitzen vier transmembranale Domänen (TMD) mit einer großen ersten und einer zweiten kleinen extrazellulären Schleife (EVS) sowie einen intrazellulären N- und C-Terminus (Abbildung 4). Die Topologie der Claudine entspricht der des Occludins.



**Abbildung 4: Allgemeine Struktur und Topologie von Claudinen.** Die Positionen konservierter geladener Aminosäuren sind mit „+“ und „-“ gekennzeichnet [Gonzalez-Mariscal, 03].

Dennoch gibt es keine Sequenzgemeinsamkeiten zwischen den Claudinen und Occludin [Furuse, 98a]. Obwohl die Claudine phylogenetisch einander ähneln, weisen sie dennoch einige strukturelle Unterschiede auf. Cld16 besitzt einen stark verlängerten N-Terminus, Cld18 eine verlängerte 2. EVS und Cld23 einen im Vergleich zu den anderen Claudinen verlängerten C-Terminus [Hewitt, 06]. Weitere phylogenetische Untersuchungen erga-

ben, dass sich Cld16 und Cld23 am stärksten von den übrigen Claudinen unterscheiden. Die größte strukturelle Ähnlichkeit besteht zwischen Cld6 und 9, gefolgt von Cld3 und 4 sowie Cld1 und 7 [Hewitt, 06]. Davon ausgehend werden die Claudinen auch in klassische und nicht klassische Claudinen eingeteilt. Zu den klassischen Claudinen gehören: Cld1 - 10, 14, 15, 17 und 19.

Claudinen sind im Gegensatz zu anderen TJ-Proteinen in der Lage, TJ-Stränge *de novo* aufzubauen. So führt die Transfektion von Claudinen in TJ-freie L-Fibroblasten zur Ausbildung von TJ-Strängen [Furuse, 98b].

Claudinen werden gewebespezifisch exprimiert [Tsukita, 01; Turksen, 04; Furuse, 06; Hewitt, 06]. So enthalten beispielsweise die TJ der BHS andere Claudinen als die TJ von Nierenepithelzellen. Da im Regelfall mindestens zwei verschiedene Claudinen in einem Gewebe exprimiert werden, bestehen TJ-Stränge aus verschiedenen Claudinisoformen.

Die Barriereigenschaften der TJ eines Gewebes werden maßgeblich von den Claudinen bestimmt, aus denen sie aufgebaut sind. Die Expression von Claudinen kann sowohl zur Erhöhung als auch zur Abnahme des TER führen. So führte beispielsweise die Expression von exogenem Cld2 in MDCK-I-Zellen zu einer Abnahme des TER um Faktor 20, was etwa dem TER von endogen Cld2-exprimierenden MDCK-II-Zellen entspricht [Furuse, 01]. Damit besteht ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der parazellulären Dichtigkeit einer Zelllinie und der Kombination der exprimierten Claudinen. Während die endogen Cld1- und Cld4-exprimierenden MDCK-I-Zellen einen TER von etwa  $11.000 \Omega \cdot \text{cm}^2$  aufwiesen, führte die zusätzliche Expression von Cld2 zu einem TER von etwa  $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . [Furuse, 01]. Im Gegensatz dazu führte die Expression von Cld5 in verschiedenen Epithelzellen zu einer Erhöhung des TER [Amasheh, 05; Wen, 04; Soma, 04]. Des Weiteren wurde nach der Expression von exogenem Cld1, Cld4, Cld5, Cld6, Cld8, Cld9, Cld11, Cld14, Cld15, Cld16, Cld18 und Cld19 in MDCK-II-Zellen ein signifikant erhöhter TER nachgewiesen [Inai, 99; Van Itallie, 01; Wen, 04; Yu, 03; Van Itallie, 03; Ben Yosef, 03; Ikari, 06; Angelow, 07a; Sas, 08].

Der Einfluss der Claudinen auf den TER ergibt sich durch die Ausbildung größen- und ladungsselektiver Poren. Am häufigsten wurde in diesem Zusammenhang untersucht, inwieweit eine erhöhte Claudinexpression zur veränderten parazellulären Permeation von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  führt. Der Einfluss einzelner Claudinen auf die elektrophysikalischen Ei-



enschaften von epithelialen und endothelialen Zelllinien ist in der Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Änderung der elektrophysikalischen Eigenschaften von epithelialen oder endothelialen Zelllinien nach exogener Expression von Claudinen** (↑ Anstieg, ↓ Abfall, ↔ unverändert, n.a.: nicht analysiert).

Protein	Zelllinie	TER	$P_{Na^+} / P_{Cl^-}$	$P_{Na^+}$	$P_{Cl^-}$	Referenz
Cld1	Eph4	↔	n.a.	n.a.	n.a.	[Furuse, 01]
Cld1	MDCK-II	↑	n.a.	n.a.	n.a.	[Inai, 99]
Cld1	MDCK-II T23	↑	n.a.	n.a.	n.a.	[McCarthy, 00]
Cld2	Caco-2	↓	↑	↑	n.a.	[Fujita, 08]
Cld2	LLC-PK1	↓	↑	n.a.	n.a.	[Van Itallie, 03]
Cld2	MDCK-I	↓	n.a.	n.a.	n.a.	[Furuse, 01]
Cld2	MDCK-C7	↓	↑	n.a.	n.a.	[Amasheh, 02; Van Itallie, 08]
Cld2	MDCK-II	↔	↔	n.a.	n.a.	[Van Itallie, 03]
Cld3	IB3.1	↔	n.a.	n.a.	n.a.	[Coyne, 03]
Cld3	MDCK-I	↔	n.a.	n.a.	n.a.	[Furuse, 01]
Cld3	NIH/3T3	↔	n.a.	n.a.	n.a.	[Coyne, 03]
Cld4	MDCK-II	↑	↓	↓	↔	[Van Itallie, 01]
Cld4	LLC-PK1	↑	↔	n.a.	n.a.	[Van Itallie, 03]
Cld5	Caco-2	↑	n.a.	n.a.	n.a.	[Amasheh, 05]
Cld5	MDCK-II	↑	↓	↓	n.a.	[Wen, 04]
Cld5	RLE	↑	n.a.	n.a.	n.a.	[Soma, 04]
Cld6	MDCK-II	↑	↓	n.a.	↓	[Sas, 08]
Cld7	Caco-2	↓	n.a.	n.a.	n.a.	[Fujita, 08]
Cld7	LLC-PK1	↑	↓	n.a.	n.a.	[Alexandre, 05]
Cld8	MDCK-I	n.a.	↔	↔	↔	[Angelow, 07b]

Cld8	MDCK-II	↑	↓	↓	↔	[Yu, 03; Angelow, 06; Jeansonne, 03]
Cld9	MDCK-II	↑	↓	n.a.	↓	[Sas, 08]
Cld10a	LLC-PK1	↓	↔	↔	↑	[Van Itallie, 06b]
Cld10a	MDCK-II	↔	↓	↓	↑	[Van Itallie, 06b]
Cld10b	LLC-PK1	↓	↔	↑	↔	[Van Itallie, 06b]
Cld10b	MDCK-II	↔	↔	↔	↔	[Van Itallie, 06b]
Cld11	LLC-PK1	↓	↔	n.a.	n.a.	[Van Itallie, 03]
Cld11	MDCK-II	↑	↓	n.a.	n.a.	[Van Itallie, 03]
Cld12	Caco-2	↓	↔	↔	n.a.	[Fujita, 08]
Cld14	MDCK-II	↑	↓	↓	↔	[Ben Yosef, 03]
Cld15	LLC-PK1	↓	↑	n.a.	n.a.	[Van Itallie, 03; Bagnat, 07]
Cld15	MDCK-I	↓	n.a.	n.a.	n.a.	[Bagnat, 07]
Cld15	MDCK-II	↑	↔	n.a.	n.a.	[Van Itallie, 03]
Cld16	LLC-PK1	↓	↑	↑	n.a.	[Hou, 05]
Cld16	MDCK-II	↑	↓	↓	↔	[Ikari, 04; Ikari, 06]
Cld16	MDCK-II	n.a.	↔	↔	↔	[Hou, 05]
Cld18	MDCK-II	↑	↓	↓	↔	[Jovov, 07]
Cld19	LLC-PK1	↑	↑	↔	↓	[Hou, 08]
Cld19	MDCK-II	↑	↓	↓	↔	[Angelow, 07a]

#### 1.3.4 Die extrazellulären Schleifen der Claudine

Bisher wurde gezeigt, dass die EZS der Claudine den parazellulären Spalt verschließen und damit die Diffusion von großen Molekülen und Proteinen verhindern. Außerdem wurde demonstriert, dass die EZS der Claudine den gezielten Transport von Ionen ermöglichen. Claudine sind in der Lage, Poren mit einem Durchmesser von etwa 6 Å zu bilden [Spring, 98]. Eine Besonderheit dieser Poren besteht darin, dass sie im Gegensatz zu konventionellen Ionenkanälen parallel zur Plasmamembran ausgerichtet sind (Abbildung 1). Da sich die durch Claudine gebildeten Poren hinsichtlich ihrer Spezifität unterscheiden, ergibt sich ein TER für eine Zelllinie, der sowohl von den abdichtenden Eigenschaften der exprimierten Claudine als auch von der Durchlässigkeit der Poren abhängt.

Die unterschiedlichen Einflüsse der Claudine auf die parazelluläre Dichtigkeit lassen sich auf die verschiedenen Aminosäuren in den EZS zurückführen. Die 1. EZS der Claudine besteht aus etwa 50 Aminosäuren. Trotz diverser Varianten innerhalb der Claudine gibt es in dieser Region einen hochkonservierten Bereich, der das Motiv GLWXXC<sub>(8-10 Aminosäuren)</sub>C beinhaltet. Die besondere Rolle der EZS bei der Ausbildung der Barrierefunktion und Ionenselektivität wurde durch das Einbringen von Mutationen in die 1. und 2. EZS und durch das Generieren chimärer Claudinproteine demonstriert. Während die Überexpression von Cld4<sub>wt</sub> in MDCK-II-Zellen zur Abnahme der parazellulären Na<sup>+</sup>-Permeabilität führt, wurde dieser Effekt nicht mehr beobachtet, wenn an Position 65 in der 1. EZS von Cld4 die basische Aminosäure K durch die saure Aminosäure D ersetzt wurde [Colegio, 02]. In einem umgekehrten Ansatz wurden eine saure Aminosäure in der 1. EZS von Cld15 durch eine basische Aminosäure substituiert. Der Austausch von D zu R an Position 55 sowie von E zu K an Position 64 führte zur Abnahme der parazellulären Na<sup>+</sup>-Permeation bei gleichzeitiger Zunahme der Cl<sup>-</sup>-Permeation, die bei Kombination der Mutationen noch größer ausfiel [Colegio, 02]. Um chimäre Claudinproteine zu generieren, wurden die EZS einzelner Claudine ausgetauscht und die Wirkung auf TER und Ionenselektivität untersucht. Ein in MDCK-II-Zellen exprimiertes Cld2 mit der 1. EZS von Cld4 bzw. beiden EZS von Cld4 führte zum deutlichen Anstieg des TER, wohingegen der abdichtende Effekt eines Cld4 mit der 1. EZS von Cld2 bzw. beiden EZS von Cld2 nur zu einem vergleichsweise geringen Anstieg des TER führte [Colegio, 03]. Für Cld4 wurde bisher nicht nur eine abdichtende Wirkung beschrieben, sondern auch eine Selektivität für Anionen. Im Gegensatz dazu bildet Cld2 selektive Kationenporen aus [Van Itallie, 01]. Die von den chimären Proteinen gebildeten TJ-Stränge wiesen die gleiche Morphologie wie die TJ-Stränge aus nativem Cld2 und Cld4 auf [Colegio, 03]. Die EZS der Claudine scheinen demnach keinen Einfluss auf die Strangbildung zu haben. Ein weiterer Einfluss der 1. EZS auf die parazelluläre Anionen- und Kationenpermeabilität wurde bei Cld16 beobachtet. Während Cld16 in LLC-PK1-Zellen eine erhöhte parazelluläre Na<sup>+</sup>-Permeabilität bewirkt, führt der Austausch der negativ geladenen Aminosäuren von Cld16 gegen ungeladene Aminosäuren zum Verlust dieses Effekts. Zusammenfassend kann die 1. EZS der Claudine neben ihrer abdichtenden Wirkung auch für die Ausbildung großen- und ionenselektiver Poren, die durch die geladenen Aminosäureseitenketten gebildet werden, verantwortlich sein und damit auch in dieser Hinsicht den TER entscheidend beeinflussen.

Die 2. EZS der Claudine besteht aus etwa 20 Aminosäuren. Dabei ist die Varianz zwischen den Claudinen im Vergleich zu den Transmembranregionen wesentlich größer [Hewitt, 06]. Die Bedeutung der 2. EZS wurde bisher wenig untersucht. Für Cld5 und 16 wurde gezeigt, dass die 2. EZS an der Lokalisation der Claudine in den TJ beteiligt ist. So führten Aminosäuresubstitutionen in diesem Bereich zum Verlust der TJ-Lokalisation in der Plasmamembran [Piontek, 08; Hou, 05].

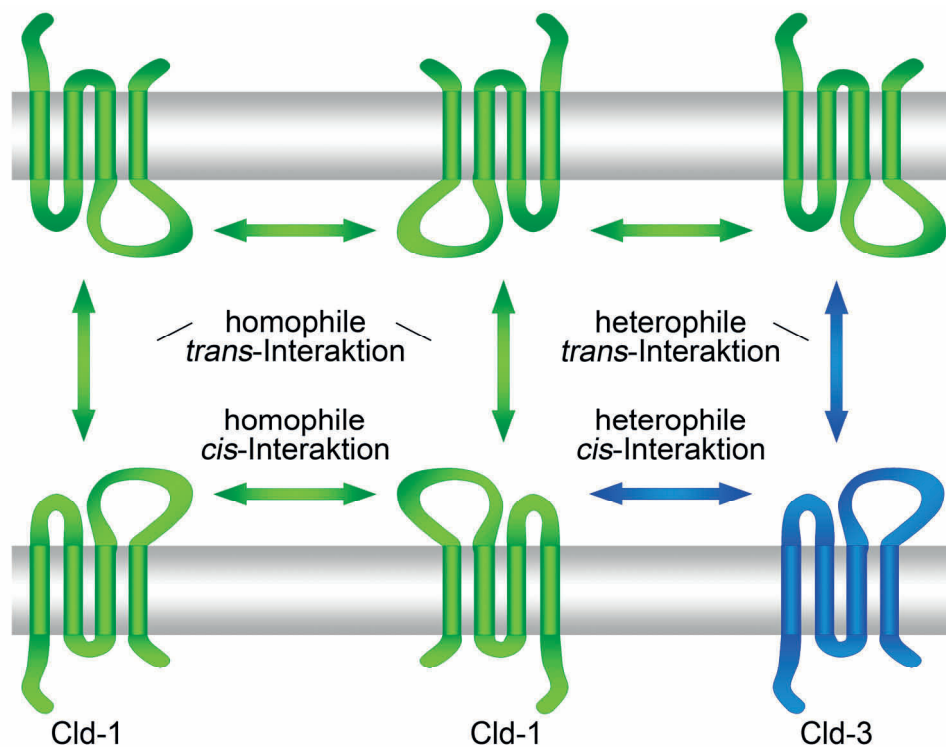
### **1.3.5 Zytoplasmatische und transmembranale Regionen der Claudine**

Der C-Terminus ist für den korrekten Einbau der Claudine in die TJ und für ihre Stabilität verantwortlich [Ruffer, 04; Arabzadeh, 06]. Über die hier lokalisierte PDZ-Bindedomäne (einzige Ausnahme Cld12) ist eine direkte Interaktion mit ZO-1, ZO-2 und ZO-3 möglich [Itoh, 99]. Darüber hinaus wurden auch Interaktionen mit weiteren zytoplasmatischen TJ-Proteinen beschrieben [Hamazaki, 02; Jeansonne, 03; Lee, 06]. Claudinmutanten, bei denen die PDZ-Bindedomäne nicht zugänglich war, waren noch immer in Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, allerdings waren die ausgebildeten TJ-Stränge wesentlich ungeordneter und nicht mehr ausschließlich auf die apikolaterale Plasmamembran beschränkt [Furuse, 99; McCarthy, 00]. Darüber hinaus ließen sich bei vielen Claudinen im C-Terminus potentielle Ser und/oder Thr-Phosphorylierungsstellen finden. So wird beispielsweise beim Cld1 der Ratte das Thr an Position 203 durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase und die Proteinkinase C phosphoryliert [Fujibe, 04; Nunbhakdi-Craig, 02]. Weitere Phosphorylierungen wurden für Cld5 (Ratte, T207) und Cld3 (Mensch, Y193) durch die cAMP-abhängige Proteinkinase sowie für Cld1 - 4 durch die Lysin-defiziente Proteinkinase 4 gezeigt [Ishizaki, 03; Soma, 04; D'Souza, 05; Yamauchi, 04]. Die Phosphorylierung des humanen Cld4 am Thr 208 durch die Rezeptortyrosinkinase EphA2 hatte eine direkte Wirkung auf die Ausbildung der TJ. Sie führte zu einer reduzierten Assoziation von Cld4 mit ZO-1, einem verminderten Einbau von Cld4 in Zell-Zell-Kontakte und einem langsameren Wiederaufbau der TJ nach kalziumfreien Kulturbedingungen [Tanaka, 05]. Für Cld5 wurde in einer Endothelzelllinie nachgewiesen, dass Phosphorylierungen einen Einfluss auf die Barrierefunktion haben. Der Verlust der Phosphorylierungsstelle durch Substitution von Thr durch Ala an Position 207 führte zu einem signifikant höheren Widerstand im Vergleich zum Wildtyp-Cld5 [Soma, 04].

Die Funktion des zwei bis sechs Aminosäuren umfassenden N-Terminus der Claudine ist unbekannt. Im Gegensatz dazu konnten einige Funktionen der vier TMD durch human-pathogene Mutationen aufgeklärt werden. Mutationen im Cld14, 16 und 19 führten bei den Betroffenen unter anderem zu Nierenfunktionsstörungen, einschließlich daraus resultieren Konsequenzen [Wattenhofer, 05; Hou, 05; Konrad, 06]. Nach Aminosäuresubstitutionen in der 4. TMD von Cld16 konnte gezeigt werden, dass diese Mutanten im endoplasmatischen Retikulum verbleiben und daher nicht mehr in der Plasmamembran lokalisiert sind [Hou, 05]. Dennoch basiert der Strukturbereich der vier TMD nur auf Sekundärstrukturvorhersagen und wurde experimentell noch nicht nachgewiesen.

### 1.3.6 Claudininteraktionen

Die abdichtende Funktion der Claudine ergibt sich aus der Wechselwirkung von benachbarten Claudinen innerhalb einer Plasmamembran (*cis*-Interaktionen) sowie von Claudinen in der gegenüberliegenden Plasmamembran der benachbarten Zelle (*trans*-Interaktionen) (Abbildung 5). Die *cis*-Interaktion von Claudinen innerhalb einer Plasmamembran führt zur Strangbildung. Diese Stränge wiederum können über eine *trans*-Interaktion mit den parallel orientierten TJ-Strängen in der gegenüberliegenden Plasmamembran der benachbarten Zelle interagieren und somit gepaarte TJ-Stränge ausbilden [Furuse, 99]. Dabei können sowohl identische Claudinisoformen (homophile Interaktion) als auch verschiedene Claudinisoformen (heterophile Interaktion) miteinander interagieren (Abbildung 5). Beispielsweise wurde bei einer gemeinsamen Kultur von Cld1-, Cld2- oder Cld3-transfizierten L-Fibroblasten beobachtet, dass Cld3-Stränge sowohl mit Cld1- als auch Cld2-Strängen assoziierten, wohingegen keine Assoziation zwischen Cld1- und Cld2-Strängen auftrat [Furuse, 99].



**Abbildung 5: Schematische Darstellung möglicher homophiler und heterophiler Claudinin-Interaktionen**

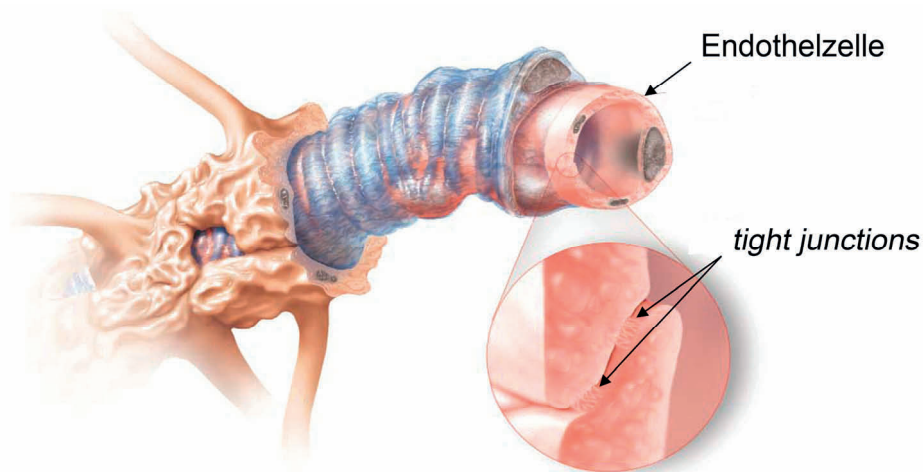
In Zellen, die endogen weder TJ ausbilden noch Occludin oder JAM exprimieren, führt die Expression von exogenen Claudinen zur Ausbildung von TJ-Strängen. Das kann als Hinweis auf Claudinin-Interaktionen angesehen werden. Homopolymere Claudinstränge wurden für die Claudine 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 14 und 19 nach Transfektion in HEK-293-Zellen, murine L-Fibroblasten und COS-7 Zellen mittels Gefrierbruchelektronenmikroskopie nachgewiesen [Sonoda, 99; Furuse, 98b; Furuse, 99; Piontek, 08; Morita, 99b; Turksen, 01; Nunes, 06; Wattenhofer, 05; Miyamoto, 05]. Heteropolymere kontinuierliche Claudinstränge wurden für die Kombinationen Cld1/Cld3 und Cld1/Cld3/Cld5 beschrieben. Die Kombinationen Cld1/Cld2 sowie Cld2/Cld3 führen zu diskontinuierlichen Strängen [Furuse, 99; Coyne, 03].

Für homophile Cld5-Interaktionen wurde in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt, dass einzelne Aminosäuren der 2. EZS von Cld5 für die Wechselwirkung von Cld5-Proteinen in gegenüberliegenden Zellen verantwortlich sind [Piontek, 08]. Nach Transfektion von Cld5<sub>wt</sub>-YFP in claudinfreie, TJ-lose HEK-293-Zellen wurde eine Anreicherung dieses Fusionsproteins in den benachbarten Plasmamembranen transfizierter Zellen

beobachtet. Allerdings reicherte es sich nicht in den Plasmamembranen transfizierter Zellen an, die an untransfizierte Zellen grenzten. Wenn eine transfizierte Zelle an keine weitere transfizierte Zelle grenzte, waren die Cld5-Signale gleichmäßig über die gesamte Plasmamembran verteilt. Um die Bedeutung einzelner Aminosäuren in der 2. EZS von Cld5 zu untersuchen, wurden sie gegen A oder Q ausgetauscht. Bei den Aminosäuresubstitutionen Y148A, Y158A und E159Q wurde infolge fehlender *trans*-Interaktion ein vollständiger Verlust der Kontaktanreicherung von Cld5-YFP in den benachbarten Plasmamembranen von transfizierten HEK-293-Zellen beobachtet. Die Substitution von K nach A an Position 157 hingegen führte zum vollständigen Verlust der Membranlokalisation von Cld5. Die subzelluläre Lokalisation der Cld5<sub>R145A</sub>-Mutante unterschied sich nicht von der des Cld5<sub>wt</sub>.

### 1.3.7 Claudin-5 und die Blut-Hirn-Schranke

Die TJ spielen beim Aufbau der 1885 von Paul Ehrlich erstmalig beschriebenen Blut-Hirn-Schranke (BHS) eine wichtige Rolle [Reese, 67; Brightman, 69; van Deurs, 79]. Sie verbinden einzelne Gehirnkapillarendothelzellen und schränken damit die freie parazelluläre Diffusion von Stoffen aus dem Blut ins Gehirn ein [Pardridge, 05]; Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus der Blut-Hirn-Schranke** (modifiziert nach [Miller, 04])

Durch die BHS wird das neuronale Gewebe vor im Blut zirkulierenden toxischen Stoffen geschützt und die Homöostase im Gehirn aufrechterhalten. Für Gehirnkapillarendothelzellen sind hohe TER-Werte zwischen  $1000 - 1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  charakteristisch [Butt, 90]. In den TJ der BHS wurden bisher die Claudine 1, 3, 5 und 12 nachgewiesen [Morita, 99b; Wolburg, 02; Wolburg, 03; Liebner, 00b; Forster, 07; Nitta, 03]. Außerdem wurden Occludin, JAM-1 sowie ZO-1 mittels Immunogoldmarkierung in humanen Gehirnkapillaren nachgewiesen [Vorbrot, 04].

Insbesondere Cld5 scheint für den Aufbau der BHS von großer Bedeutung zu sein. Bei *Cld5-knock out*-Mäusen war die BHS für Moleküle mit einem Molekulargewicht  $< 800 \text{ Da}$  stärker durchlässig, wohingegen für größere Moleküle der Eintritt in das Hirngewebe nicht möglich war [Nitta, 03]. Die erhöhte parazelluläre Permeation von Molekülen  $< 800 \text{ Da}$  hatte einen letalen Effekt. Die Mäuse wurden zwar lebend geboren, starben jedoch zehn Stunden nach der Geburt [Nitta, 03]. Allerdings wiesen die in der BHS der *Cld5-knock out*-Mäuse gebildeten TJ keine mikroskopischen Besonderheiten auf [Nitta, 03]. Bei Wildtypmäusen führte der transiente *knock down* von Cld5 mittels Cld5-siRNA ebenfalls zu einer größenselektiven Öffnung der BHS. Für kleine Markermoleküle (443 und 782 Da) wurde eine erhöhte Durchlässigkeit festgestellt. Die Durchlässigkeit für größere Moleküle (4400 Da) war hingegen unverändert [Campbell, 08].

Aufgrund der großen Bedeutung von Cld5 für die parazelluläre Dichtigkeit der BHS gegenüber Molekülen  $< 800 \text{ Da}$  könnte Cld5 als molekulares Ziel für die größenselektive Öffnung der BHS genutzt werden. Durch gezieltes, reversibles Ausschalten der Cld5-vermittelten Abdichtung des parazellulären Spalts könnten kleine Wirkstoffmoleküle, die zur Therapie von Gehirnerkrankungen geeignet sind, die BHS überwinden. Gleichzeitig bliebe die Abdichtung des parazellulären Spalts gegenüber größeren, unerwünschten Molekülen (z. Bsp. Albumin) erhalten.

### 1.3.8 Claudinassozierte Erkrankungen

Aufgrund der zentralen Bedeutung der Claudine für die Ausbildung der TJ führen Mutationen oder eine veränderte Expression dieser Proteine zu verschiedenen Erkrankungen. Mögliche Folgen sind Tumore, inflammatorische Erkrankungen, Nierenfunktionsstörungen, bakterielle Infektionen sowie Schädigungen des Hörvermögens. Mutationen innerhalb eines Claudingens oder eine veränderte Claudinexpression können in Abhängigkeit



von dem betroffenen Claudin zu einer geringeren oder erhöhten parazellulären Dichtigkeit führen. Letzteres trifft auf Nierenerkrankungen zu, die mit Claudinmutationen assoziiert sind. In unterschiedlichen Nierenregionen, die verschiedene Reabsorptions- und Exkretionsaufgaben gewährleisten, sind die TJ aus unterschiedlichen Claudinen zusammengesetzt [Kiuchi-Saishin, 02; Enck, 01; Abuazza, 06; Angelow, 07a; Li, 04; Van Itallie, 06b; Konrad, 06; Simon, 99]. Die Expression von Cld16 ist auf den dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (*pars recta*) und den anschließenden distalen Konvolut (*pars convoluta*) des Nephrons beschränkt. Hier erfolgt die Reabsorption von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  vermutlich durch Poren, die von Cld16 gebildet werden [Simon, 99]. Verschiedene Mutationen im Cld16 (gehäuft in der 1. EZS) führen zu einer gestörten Reabsorption von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  und damit zu *familia hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis* (FHHNC), einer autosomal-rezessiven Erkrankung. Die betroffenen Patienten weisen eine verminderte Magnesiumkonzentration im Blut, eine erhöhte Kalziumkonzentration im Urin sowie Kalziumablagerungen in den Nieren auf [Simon, 99; Weber, 01; Müller, 03; Kausalya, 06; Praga, 95; Simon, 99]. Derselbe renale Phänotyp wurde bei einer Mutation in der 1. EZS von Cld19 gefunden [Konrad, 06]. Auch diese Mutation stört die Ausbildung funktionell aktiver Poren, was zu einer verminderten Reabsorption von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  führt. Da Cld19 neben der Niere auch im Auge exprimiert wird, zeigen die betroffenen Patienten neben den genannten Nierenfunktionsstörungen auch Erkrankungen des visuellen Systems [Konrad, 06]. Eine weitere autosomal-rezessive Erkrankung wird durch eine Mutation im Cld14 verursacht, durch die die Patienten unter Taubheit leiden [Wilcox, 01; Ben Yosef, 03].

Doch nicht immer sind nur einzelne Claudine betroffen. Bei der Autoimmunerkrankung Morbus Crohn, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, weisen die Epithelzellen des sigmoidalen Colons der Patienten einen deutlich reduzierten TER auf, der sich durch die geringere Expression der abdichtenden Claudine 5 und 8 sowie die erhöhte Expression des porenbildenden Cld2 ergibt [Zeissig, 07]. Darüber hinaus bestehen die gebildeten TJ nur aus diskontinuierlichen Strängen [Zeissig, 07].

Besonders häufig wurden Veränderungen der Claudinexpression bei Tumoren beschrieben. Bei vielen Tumoren ist die Expression von Cld1 reduziert. Daher wird vermutet, dass eine geringe Cld1-Expression eine Voraussetzung für die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen darstellt [Forster, 08]. Gleichzeitig wurde auch eine Überexpressi-

on von Cld3 und 4 gefunden. Beispiele für Tumoren mit bekannter veränderter Claudinexpression sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Veränderte Claudinexpression bei Tumorerkrankungen**

Tumor	Betroffene Claudine	Referenz
Barrett-Metaplasie	Cld1 ↓	[Rendon-Huerta, 03]
Brustkrebs	Cld1 ↓, 3 ↑, 4 ↑, 7 ↓	[Tokes, 05; Hewitt, 06; Kominsky, 03; Kominsky, 04]
Dickdarmtumor	Cld1 ↑	[Miwa, 01]
Eierstocktumor	Cld3 ↑, 4 ↑, 7 ↑	[Hewitt, 06; Rangel, 03; Hough, 00]
Glioblastoma multiforme	Cld1 ↓, 3 ↓	[Liebner, 00a; Wolburg, 03]
Lebertumor	Cld7 ↑	[Hewitt, 06]
Lungentumor	Cld3 ↑, 4 ↑, 7 ↑	[Hewitt, 06]
Magengeschwür	Cld3 ↑, 4 ↑, 7 ↑	[Hewitt, 06]
Nierentumor	Cld3 ↑	[Hewitt, 06]
Pankreastumor	Cld4 ↑, 7 ↑	[Hewitt, 06; Sato, 04; Nichols, 04]
Perineurioma	Cld1 ↓	[Folpe, 02]
Prostatatumor	Cld1 ↓, 3 ↑, 4 ↑, 7 ↓	[Sheehan, 07; Hewitt, 06; Long, 01]
Schilddrüsenadenom	Cld1 ↓, 4 ↓, 7 ↓	[Tzelepi, 08]
Speiseröhrenkrebs	Cld1 ↓	[Miyamoto, 08]
Uterustumor	Cld3 ↑, 4 ↑	[Santin, 07]

Mutationen innerhalb eines Claudingens oder eine veränderte Expression der Claudine sind nicht die einzigen Ursachen für eine claudinassoziierte Erkrankung. Eine bakterielle oder virale Infektion kann die Funktion der Claudine ebenfalls beeinflussen. So entfaltet beispielsweise das bakterielle Enterotoxin des *Clostridium perfringens* (CPE) seine Wirkung, indem es an Cld3 und 4 bindet und die betroffene Zelle innerhalb von fünf Minuten lysiert [McClane, 79]. Gegenwärtig versucht man, diesen Effekt durch den Einsatz verschiedener CPE-Fragmente therapeutisch zu nutzen [Kominsky, 07]. Des Weiteren kann eine *Helicobacter pylori* Infektion im Magenepithel zum Verlust der Expression von Cld4 und 5 führen [Fedwick, 05]. Ferner wurde gezeigt, dass die 1. EZS von Cld1, Cld6 und

Cld9 beim Eindringen des Hepatitis-C-Virus in die Wirtszelle als Corezeptor dient [Evans, 07; Meertens, 08].

## **1.4 Bestimmung des parazellulären Widerstands**

### **1.4.1 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstands im klassischen Filterkultursystem**

Die Bestimmung des TER von Epithel- und Endothelzellen im Filterkultursystem ist eine verbreitete Methode, um die Ausbildung von TJ oder deren Veränderung zu untersuchen. Dabei werden Zellen standardmäßig auf transmembranalen Zellkultureinsätzen ausgesät, so dass nach dem Erreichen der Konfluenz der parazelluläre Widerstand mit einer Silber-Silberchlorid-Handelektrode und einem Volt-Ohm-Meter gemessen wird [Balda, 93; Wen, 04; Mrsny, 08; Volpe, 08]. Dabei taucht eine Elektrode in das apikale Medium über den Zellen ein, während die andere Elektrode in das basale Kompartiment unter den Zellen gehalten wird.

Obwohl diese Technik gegenwärtig die Standardmethode zur Bestimmung des parazellulären Widerstands darstellt, gibt es zahlreiche Parameter, die die Vergleichbarkeit gemessener Werte erschweren. Beispielsweise hängt der gemessene Widerstand vom verwendeten Filtermaterial ab [Lo, 99]. So weisen MDCK-II-Zellen auf Nylon- oder Nitrozellulosefiltern Widerstände zwischen  $40 - 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$  auf, wohingegen der Einsatz von Polycarbonatfiltern zu Widerständen zwischen  $100 - 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und sogar über  $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  führt [Barker, 81; Cereijido, 78; Wen, 04; Lo, 99; Van Itallie, 03; Jovov, 07; Angelow, 07a]. Auch beeinflussen Porenanzahl und -größe des Filtermaterials den gemessenen Widerstand. Die Beschichtung der Filter mit einer extrazellulären Matrix hat ebenfalls einen Einfluss auf den gemessenen Widerstand. Bei Widerstandsmessungen im klassischen Filterkultursystem kann nicht zwischen dem Teil des gemessenen Widerstands, der auf der Ausbildung von TJ zwischen den Zellen beruht (dem eigentlichen TER) und dem Teil des gemessenen Widerstands, der durch die Adhäsion der Zellen an das Substrat verursacht wird, unterschieden werden. Folglich wird der gesamte Widerstand gemessen, der sich aus beiden Teilwiderständen zusammensetzt. So können Zellen in einer Widerstandsmessung zwar identische Werte generieren, aber die Werte können entweder auf der Ausbildung dichter TJ oder auf einer starken Adhäsion an das

Substrat beruhen. Dabei bleibt unklar, welchen Beitrag jeder Teilwiderstand leistet. Ein weiteres Problem dieser Methode besteht darin, dass keine kontinuierliche Aufzeichnung des Widerstands möglich ist, was den Nachweis relevanter Werte beeinträchtigt.

#### **1.4.2 Bestimmung des parazellulären Widerstands im *Electric cell-substrate Impedance Sensing*-System**

Aufgrund der Probleme bei der TER-Bestimmung im klassischen Filterkultursystem wurde eine Methode entwickelt, bei der die Zellen direkt auf Elektroden ausgesät werden und der Widerstand kontinuierlich von einem Computer aufgezeichnet wird [Giaever, 91; Tirupathi, 92; Lo, 99; Wegener, 00; Arndt, 04; McCoy, 05]. Ein Vorteil dieser als *Electric cell-substrate Impedance Sensing* (ECIS) bezeichneten Methode besteht darin, dass innerhalb des Gesamtwiderstands (Impedanz) zwischen dem parazellulären Widerstand  $R_b$  (*junctional resistance*) und dem Widerstand  $\alpha$ , der aus der Adhäsion der Zellen an das Substrat resultiert, unterschieden werden kann. Auch lassen sich Aussagen zur Membrankapazität ( $C_m$ ) und zu Mikrobewegungen der Zellen treffen [Giaever, 91]. Ein weiterer Vorteil der ECIS-Messung besteht in der automatisierten Aufzeichnung der Messwerte, die gewährleistet, dass keine relevanten Messpunkte verloren gehen.

Im Gegensatz zum Volt-Ohm-Meter, das Gleichstrom liefert, wird bei der ECIS-Messung Wechselstrom genutzt. Aufgrund der verschiedenen physikalischen Prinzipien, auf denen beide Messverfahren beruhen, ist es nicht möglich, Widerstände, die mit diesen Methoden gemessen wurden, direkt miteinander zu vergleichen. Überdies sind ECIS-Messungen, die mit Trägern durchgeführt wurden, auf denen sich nur eine Elektrode befindet, nicht mit ECIS-Messungen vergleichbar, die mit Trägern durchgeführt wurden, die 10 oder 40 Elektroden enthalten, weil zwischen verschiedenen Elektroden Wechselströme auftreten. Des Weiteren wird die Frequenz, die zur Messung des Widerstands verwendet wird, für jede Zelllinie optimiert, was wiederum einen direkten Vergleich gemessener Widerstände verhindert.

#### **1.4.3 Bestimmung des parazellulären Widerstands im cellZscope**

Seit kurzem ist mit dem cellZscope ein Messsystem verfügbar, bei dem die Zellen auf Filtern kultiviert werden und der parazelluläre Widerstand aus der Impedanz berechnet

wird. Diese Technik kombiniert die Vorteile der TER-Messung im klassischen Filterkultursystem und der parazellulären Widerstandsmessung im ECIS-System.

## **1.5 Beeinflussung der parazellulären Dichtigkeit von Epithelzellen**

Die gezielte Öffnung von TJ, insbesondere in der BHS, ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Vor allem die Behandlung von Gehirntumoren erweist sich als problematisch, da 90 % der potentiell wirksamen Zytostatika die BHS nicht überwinden können. Als allgemeine Regel gilt, dass lipophile Moleküle  $< 500$  Da die BHS passieren [Miller, 04]. Andere Stoffe benötigen für den Eintritt ins Gehirn einen Transporter. Obwohl sich die pharmazeutische Industrie auf die Entwicklung kleiner Moleküle konzentriert und damit bei der Behandlung von Epilepsie, chronischen Schmerzen, Depressionen und Schizophrenie erfolgreich war, konnten bislang noch keine kleinen Moleküle entwickelt werden, die bei der Behandlung von Alzheimer, Chorea Huntington, Schlaganfällen und Hirntumoren wirksam sind [Miller, 04]. Zwar wäre es möglich, den Transport von Wirkstoffen durch die BHS ins Gehirn durch gezielte Beeinflussung von Transportern, die in Endothelzellen exprimiert werden, zu verbessern. Allerdings ist dieser Ansatz ineffizient, da jeder Transporter nur eine begrenzte Anzahl von Wirkstoffen transportiert. Auch kann diese Strategie nicht für Wirkstoffe genutzt werden, für die kein Transporter in der BHS exprimiert wird. Daher wird gegenwärtig die Strategie bevorzugt, die gesamte BHS für einen definierten Zeitraum zu öffnen. Ein Nachteil dieser Strategie besteht darin, dass nicht nur dem gewünschten Wirkstoff der Zugang zum Gehirn ermöglicht wird.

### **1.5.1 Osmotisch aktive Substanzen**

Mannitol wird zur Öffnung der BHS bereits in der klinischen Praxis angewandt. Diese Methode wurde vor über 20 Jahren entwickelt und stellt das erste Verfahren dar, das am Menschen zugelassen wurde [Neuwelt, 79; Neuwelt, 80; Siegal, 00; Kroll, 98]. Dabei wird eine hochmolare Mannitollösung in die Nackenarterie des Patienten injiziert. Infolge der höheren Osmolarität der Zuckerlösung wird das Wasser aus den Endothelzellen gezogen, was zum Schrumpfen der Zellen und einem damit verbundenen Aufbrechen des *junctional complex* führt. Mit dieser Methode kann die BHS bis zu 40 Minuten geöffnet werden [Siegal, 00]. Tierstudien haben gezeigt, dass bei mannitolbehandelten Tieren im

Vergleich zu den unbehandelten Tieren eine 10- bis 100-fach höhere Menge der eingesetzten Medikamente ins Gehirn eindringen kann. Diese Öffnung der BHS wurde mit Mannitolkonzentrationen von 1,4 - 1,6 M erreicht [Neuwelt, 80]. Beim Einsatz geringerer Konzentrationen um 1,1 M blieb die Wirkung aus [Rapoport, 80; Ikeda, 02]. Allerdings konnte mit 1,1 M Mannitol, das auf 4°C abgekühlt wurde, die gleiche Wirkung wie mit 1,6 M Mannitol erzielt werden, dessen Temperatur 24°C betrug [Ikeda, 02]. Nach Behandlung mit 1,6 M Mannitol wurden regionale Unterschiede in der parazellulären Permeation beobachtet. Daraus wurde geschlossen, dass trotz der geöffneten BHS nicht alle Teile des Gehirns für die Moleküle gleich gut zugänglich sind [Brown, 04].

### 1.5.2 *Clostridium perfringens* Enterotoxin

Das Bakterium *Clostridium perfringens* sezerniert das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE), ein 319 Aminosäuren langes und damit etwa 35 kDa großes Polypeptid. Bei Infektionen mit *Clostridium perfringens* führt CPE zum Absterben der infizierten intestinalen Epithelzellen, was sich klinisch in Durchfallerkrankungen manifestiert und als Lebensmittelvergiftung vom Typ A klassifiziert ist.

Das CPE-Protein weist fünf funktionelle Regionen auf. Die N-terminalen 44 Aminosäuren reduzieren die zytotoxische Wirkung des CPE. Beispielsweise wies CPE<sub>45-319</sub> im Vergleich zum CPE<sub>1-319</sub> die doppelte zytotoxische Wirkung auf [Kokai-Kun, 97]. Eine weitere N-terminale Verkürzung des CPE hingegen führt zum Verlust der zytotoxischen Wirkung. So zeigten CPE<sub>53-319</sub> sowie Konstrukte mit größeren N-terminalen Deletionen keine zytotoxische Wirkung, obwohl die Bindung an den Rezeptor nicht beeinträchtigt war [Kokai-Kun, 97]. Eine weitere bedeutsame Region umfasst die Aminosäuren 45 - 53, die an der Bildung eines großen CPE-Komplexes und einer Zelllyse beteiligt sind [Smedley, III, 04]. Es wird vermutet, dass die Aminosäuren 81 - 106 für die Porenbildung verantwortlich sind. So bilden CPE-Deletionsmutanten ohne diesen Bereich zwar CPE-Komplexe, ändern aber die Permeabilität der Plasmamembran nicht. Als längstes nicht-zytotoxisches CPE-Deletionskonstrukt wurde CPE<sub>116-319</sub> beschrieben [Kokai-Kun, 99]. Die Aminosäuren 185 - 319 sind für Interaktionen mit Claudinen verantwortlich. Dabei sind die 30 C-terminalen Aminosäuren für die Bindung an den CPE-Rezeptor essentiell [Hanna, 91; Kokai-Kun, 97]. Bereits der Verlust der fünf C-terminalen Aminosäuren führt zum Verlust der Bindung an den Rezeptor [Kokai-Kun, 97; Takahashi, 05; Kondoh, 06]. Gleichzeitig

hat CPE<sub>290-319</sub>, das nur die Bindungsregion enthält, keinen Einfluss auf den TER von Caco-2-Zellen oder die intestinale Aufnahme von 4 kDa-FITC-Dextran bei Ratten [Masuyama, 05]. In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2008 wurde jedoch eine Senkung des TER von Caco-2-Zellen durch CPE<sub>290-319</sub> beschrieben [Ling, 08].

Als endogene CPE-Rezeptoren wurden zwei TJ-Proteine identifiziert [Katahira, 97a; Katahira, 97b]. Nachdem gezeigt wurde, dass es sich dabei um Cld3 und Cld4 handelte [Sonoda, 99; Fujita, 00] versuchte man, diesen Befund für die Tumorthherapie zu nutzen, da die Expression von Cld3 und Cld4 in Tumoren erhöht ist [Kominsky, 04; Kominsky, 07]. Während zur Tumorbekämpfung das *full length*-CPE genutzt wird, um die Tumorzellen zu lysieren, werden zur Öffnung von TJ CPE-Deletionskonstrukte eingesetzt, denen die 183 N-terminalen Aminosäuren fehlen. CPE<sub>184-319</sub> (C-CPE) bindet an Cld3 und 4, wodurch es den parazellulären Widerstand epithelialer Zellen signifikant senkt, aber nicht zur Lyse der Zellen führt [Sonoda, 99; Takahashi, 05; Masuyama, 05; Harada, 07]. Allerdings wurde bisher die Reduktion des parazellulären Widerstands durch CPE fast ausschließlich bei basolateraler Applikation beobachtet [Sonoda, 99; Takahashi, 05; Masuyama, 05]. Eine Reduktion des parazellulären Widerstands bei apikaler Anwendung von C-CPE wurde bisher nur in einer Publikation beschrieben. Sie trat bei der Behandlung von SKOV3 Zellen (Tumorzellen aus humanen Ovarien) mit C-CPE auf [Litkouhi, 07]. Allerdings wurden die Widerstandsmessungen nicht auf Zellkulturfiltern, sondern im ECIS-System durchgeführt, in dem die Zellen schlechter polarisieren, so dass die TJ für C-CPE leichter zugänglich sind [Butor, 92].

### 1.5.3 *Tight junction-Peptide*

Claudinpeptide stellen neue Wirkstoffe zum Öffnen von TJ dar. Beispielsweise wurde beobachtet, dass das Peptid Cld1<sub>53-80</sub>, das die Aminosäuren 53 - 80 der 1. EZS von Cld1 umfasst, die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen senkt. Die Behandlung von Cld1-exprimierenden T84-Zellen (humane Kolonadenokarzinomzelllinie) mit 25 µM Cld1<sub>53-80</sub> führte zu einer signifikanten Reduktion des TER und einer erhöhten parazellulären Permeation von 3 kDa-FITC-Dextran [Mrsny, 08]. Ebenso wurde bei Ratten nach *in vivo* Behandlung mit Cld1<sub>53-80</sub> eine erhöhte gastrische Permeation nachgewiesen [Mrsny, 08].

Ähnliche Effekte wurden auch mit Occ<sub>184-227</sub>, einem 44 Aminosäuren umfassenden Peptid, dessen Sequenz den Aminosäuren 184 - 227 in der 2. EZS von Occludin entsprach,

nachgewiesen. Die Behandlung von in A6 Zellen (Nierenepithelzelllinie aus dem Krallenfrosch) mit 5  $\mu\text{M}$  Occ<sub>184-227</sub> führte zur Reduktion des TER sowie zur Erhöhung der parazellulären Permeation von Mannitol, Inulin, 30 kDa Dextran und 40 kDa Dextran [Wong, 97].

Ein ähnlicher Effekt wurde für das 19 Aminosäuren umfassende Peptid Occ<sub>210-228</sub> gezeigt, das ebenfalls einem Abschnitt der 2. EZS von Occludin entsprach. Die Behandlung von T84-Zellen mit 200  $\mu\text{M}$  Occ<sub>210-228</sub> führte zur signifikanten Reduktion des TER und zur Erhöhung der parazellulären Permeation von 3 kDa-FITC-Dextran [Nusrat, 05].

Neben Peptiden, deren Aminosäuresequenzen von *tight junction*-Proteinen abgeleitet wurden, konnten die TJ auch durch Peptide geöffnet werden, deren Aminosäuresequenz keinem TJ-Protein nachempfunden wurde [Reddy, 93; Broughman, 04; Johnson, 05b; Chen, 06]. Lipide wurden ebenfalls erfolgreich zur Senkung des TER eingesetzt [Chen-Quay, 08].

#### **1.5.4 Caprat**

Die TJ öffnende Wirkung von Caprat (Natriumdecanoat, C10) wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass die Aufnahme von nicht TJ gängigen Medikamenten durch gleichzeitige Gabe von Caprat deutlich erhöht werden konnte. Die Wirkung von Caprat beruht auf einer Interaktion mit der Phospholipase C (PLC) in der Plasmamembran, durch die wiederum  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden.  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert die *myosin light chain kinase* (MLCK), die daraufhin Calmodulin bindet und somit zu calmodulin-abhängigen Kontraktionen der Aktinmikrofilamente und zu Catherinendozytose führt. Infolge dieser Prozesse brechen die TJ auf [Sawada, 91; Lindmark, 98]. Die Wirkung von Caprat auf die TJ konnte durch Hemmung der PLC aufgehoben werden [Tomita, 95; Lindmark, 98].

#### **1.5.5 Weitere Ansätze zur Öffnung der *tight junctions***

Gegenwärtig wird der Einsatz von Bradykinin zur spezifischen Öffnung der BHS bei Gehirntumoren diskutiert. Obwohl Gehirntumoren die Integrität der BHS stören können, wurde keine stärkere Permeation von Stoffen ins Gehirn beobachtet [Erdlenbruch, 03].



Die Gabe geringer Bradykinindosen führte bei primären Gehirnendothelzellen zur geringeren Expression von ZO-1, Cld5 und Occludin sowie zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts. Dadurch war die Durchlässigkeit der primären Gehirnendothelzellen für Meerrettichperoxidase und Albumin deutlich erhöht und der TER niedriger [Liu, 08]. Auch mit dem Bradykinin Analogon RMP-7 wurde eine Öffnung der BHS erzielt [Sanovich, 95].

Die Möglichkeiten des Einsatzes von siRNA werden ebenfalls gegenwärtig getestet. Die Injektion von Cld5-siRNA in Mäuse führte zur Reduktion der Expression von Cld5, die sich erst drei bis sieben Tage nach der Applikation normalisierte. Der transiente *knock down* von Cld5 erhöhte die Durchlässigkeit der BHS für kleine Markermoleküle (443 und 782 Da), ohne jedoch die Durchlässigkeit für größere getestete Moleküle (4400 Da) zu beeinflussen [Campbell, 08]. Dieser Befund ist mit der Beobachtung konform, dass die BHS von Cld5-*knock-out*-Mäusen für Moleküle < 800 Da durchlässiger war als bei Wildtypmäusen [Nitta, 03].

Die Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  ist für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der TJ essentiell [Pitelka, 83; Gonzalez-Mariscal, 90]. Werden MDCK-II-Zellen in konfluenter Dichte in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  ausgesät, bilden sie innerhalb von 12 - 16 h TJ aus [Cereijido, 78]. In Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  werden die Komponenten der TJ zwar synthetisiert, erreichen aber die Plasmamembran nicht, sondern akkumulieren im Bereich des Golgi-Apparats [Gonzalez-Mariscal, 90]. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Ausbildung und Aufrechterhaltung von TJ kann mit dem *calcium switch assay* untersucht werden. Dabei werden Zellen zunächst in Medium mit normaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kultiviert. Anschließend folgt eine Inkubation in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium und darauf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Resupplementierung.

## 1.6 Zielstellung

TJ verschießen einerseits die parazellulären Zwischenräume und bilden andererseits ladungs- sowie größenselektive Poren aus. Damit gewährleisten sie die Homöostase einzelner Organe und sind für das Leben unerlässlich. Gleichzeitig stellen TJ für die Therapie vieler Erkrankungen ein Hindernis dar, weil sie zahlreiche potentiell wirksame und vor allem bereits verfügbare Wirkstoffe aus dem Zielgewebe ausschließen. Beispielsweise können viele Patienten, die an Gehirntumoren leiden, nicht adäquat behandelt werden, weil die verfügbaren und potentiell wirksamen Wirkstoffe die BHS nicht oder kaum über-

winden können. Die gezielte pharmakologische Hemmung von auswärtsgerichteten Transportern der BHS verbessert aufgrund deren hohen Substratspezifität jeweils nur die Penetrationsfähigkeit weniger Wirkstoffe. Im Gegensatz dazu könnte eine gezielte, temporär begrenzte Öffnung der TJ der BHS den Eintritt vieler und vor allem strukturell verschiedener Wirkstoffe ins Gehirn verbessern und damit einen breiteren therapeutischen Nutzen erzielen.

Um die TJ der BHS gezielt temporär öffnen zu können, ist es notwendig, den Aufbau der BHS genau zu untersuchen. Da Claudine den Hauptbestandteil der TJ-Stränge ausmachen und als einzige TJ-Proteine in der Lage sind, TJ-Stränge *de novo* zu bilden, fällt ihnen die Schlüsselrolle bei der therapeutischen Öffnung der TJ zu. Für die Dichtigkeit der BHS ist Cld5 von besonderer Bedeutung. Cld5-*knock out*-Mäuse bilden eine BHS aus, die für Moleküle  $< 800$  Da durchlässig ist [Nitta, 03]. Es wurde bereits gezeigt, dass die 2. EZS von Cld5 für Interaktionen zwischen Cld5 in den Plasmamembranen benachbarter Zellen verantwortlich ist. Ferner wurde nachgewiesen, dass der Austausch bestimmter Aminosäuren in der 2. EZS von Cld5 in einer homogenen Cld5-Umgebung zum Verlust dieser Interaktionen führt [Piontek, 08].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung ausgewählter Aminosäuren der 2. EZS von Cld5 für die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen mit heterogener Claudinexpression untersucht werden. Dafür sollten stabil transfizierte MDCK-II-Zelllinien generiert werden, die entweder Cld5<sub>wt</sub> oder verschiedene Cld5-Mutanten exprimieren. Der Einfluss der Mutationen auf die parazelluläre Dichtigkeit der Zellen sollte durch Messung des parazellulären Widerstands und Bestimmung der Permeationskoeffizienten für Moleküle verschiedener Größenordnungen charakterisiert werden. Desweiteren sollte untersucht werden, ob die Cld5-Mutationen den Abbau und Wiederaufbau der TJ sowie die subzelluläre Lokalisation von TJ-Proteinen während und nach einer Phase  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Kulturbedingungen beeinflussen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Wirkung von TJ-modulierenden Substanzen auf die parazelluläre Dichtigkeit zu untersuchen. In Anlehnung an Untersuchungen, in denen ein Cld1-Peptid identifiziert wurde, das den TER von Epithelzellen senkt, [Mrsny, 08], sollte der Einfluss verschiedener Claudinpeptide auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen untersucht werden. Außerdem sollte der Effekt von CPE-Deletionskonstrukten auf den TER untersucht werden.

In dieser Arbeit sollte der parazelluläre Widerstand von Epithelzellen sowohl mittels TER-Messung im klassischen Filterkultursystem als mittels Impedanzmessung im ECIS-System bestimmt werden. Anschließend sollten die Vor- und Nachteile dieser beiden Techniken verglichen werden.

Insgesamt sollte mit dieser Arbeit ein Beitrag zum besseren Verständnis der molekularen Struktur von TJ als auch deren Modulation geleistet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

In Tabelle 3 sind die Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 3: Liste der Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Geräte und Materialien	Modell	Hersteller
Agarosegelkammer	Agagel Mini	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Brutschrank für Bakterienkulturen	TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator für Zellkultur	BB 6060	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator für Zellkultur	CB 210	Binder GmbH, Tüftlingen, Deutschland
Cryo-Lager- und Transportsystem für Stickstofflagerung von Zelllinien	Apollo <sup>®</sup> , Chronos <sup>®</sup>	Cryotherm, Euteneuen, Deutschland
Deckgläser	12 mm Durchmesser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Elektroporationsküvetten	1 mm	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Elektroporator für Bakterien	EasyjecT Prima	EquiBio/Thermo Electron, Milford, USA
Elektroporator für Zelllinien	Nucleofector <sup>TM</sup> I	Amaxa Biosystems, Köln, Deutschland
Filterpapier ( <i>Western Blot</i> )	Extra dickes Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	BH2-RFCA	Olympus, Hamburg, Deutschland
Gel-Dokumentationsgerät	BioDoc CCD Kamera	Biometra, Göttingen, Deutschland
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Impedanzmessgerät	CellZScope	nanoAnalytics, Münster, Deutschland
Impedanzmessgerät	ECIS <sup>TM</sup> 1600R	Applied Biophysics, NY, USA

Impedanzmessgerät	cellZscope®	nanoAnalytics, Münster, Deutschland
Klonierungsplatte	384-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Kühlzentrifuge	Sorvall Evolution RC	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
<i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop	LSM 510 META-UV	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
<i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop	LSM 510 META-NLO	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Mikrotiterplatte	96-Well, flach, transparent	TPP, Trasadingen, Schweiz
Netzteil für Elektrophorese	Power Supply 3000Xi	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Objektträger	SuperFrost®	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Parafilm	Parafilm® M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Gerät	DNA Engine	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop	Phase Contrast ULWCD 0.30	Olympus, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	MP225	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Rotator	Blood Tube Rotator SB1	Stuar Scientific, Staffordshire, England
SDS-Gelelektrophoresekommer	Mighty Small II SE250/SE260 (Hoefer)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Silber-Silberchlorid-Handelektrode	MERSSTX01	Millipore, Eschborn, Deutschland
SpeedVac	DNA 110	Savant, Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Spektrophotometer	DU 640	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Sterilwerkbank	S-1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Taumler	Polymax2040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Tischkühlzentrifuge	5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tischzentrifuge	5415C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transfermembran-Nitrozellulose	Hybond <sup>TM</sup> -ECL	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Transfermembran-Polyvinylidenfluorid (PVDF)	Hybond <sup>TM</sup> -P	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Transilluminator	Lumi-Imager F1 <sup>TM</sup>	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
Ultraschallgerät	Vibracell 72434	Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich
Volt-Ohm-Meter	Millicell <sup>®</sup> -ERS	Millipore, Eschborn, Deutschland
<i>Western Blot</i> -Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellkulturflasche	Cellbind <sup>®</sup> Surface 75 cm <sup>2</sup>	Corning, Berlin, Deutschland
Zellkulturflasche	25 und 75 cm <sup>2</sup>	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflasche	25 und 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte	Mit 6 oder 24 <i>Wells</i>	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturträger für ECIS	ECIS Träger mit 1, 10 oder 40 Elektroden	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Zellschaber	Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellzählgerät	Casy <sup>®</sup> 1 Cell Counter	Schärfe-Systems, Reutlingen, Deutschland

In Tabelle 4 sind die verwendeten Chemikalien und Kulturmedien aufgelistet.

**Tabelle 4: Liste der Chemikalien und Kulturmedien**

Name	Verwendungszweck	Hersteller
1 kb DNA-Marker (GeneRuler <sup>TM</sup> )	Agarosegelelektrophorese	Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Deutschland
Aceton	Immunfluoreszenzfärbung	J.T. Baker, Deventer, Holland
Agar-Agar	Bakterienkultur	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Auftrennung von DNA-Fragmenten	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Ampicillin-Natriumsalz	Bakterienkultur	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
APS	<i>Western Blot</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
BSA	<i>Western Blot</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Casyton®	Zellzählung	Schärfe-Systems, Reutlingen, Deutschland
Chelex	Zellkultur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DAPI	Immunfluoreszenzfärbung	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dexamethason	Zellkultur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMEM (3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 1 g/l Glukose, ohne L-Glutamin)	Zellkultur	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DMEM/HAM's F12	Zellkultur	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Zellkultur	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DNA Ladepuffer Loding Dye Solution (6 x)	Agarosegelelektrophorese	Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>ECL Western blotting detection reagents</i>	<i>Western Blot</i>	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
EGTA	Zellkultur	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Epidermaler Wachstumsfaktor	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	<i>Western Blot</i>	Merck Bioscience Ltd., Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Agarosegelelektrophorese	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Zellkultur	Biochrom, Berlin, Deutschland
FD10	Zellkultur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
FDS	Zellkultur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Forskolin	Zellkultur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

G418	Zellkultur	Merck Bioscience Ltd., Darmstadt, Deutschland
Gentamicin	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glukose	Bakterienkultur	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd	Gefrierbruchelektronenmikroskopie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycerol	Bakterienkultur	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	<i>Western Blot</i> , Oberflächenbio- tinylierung	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
HBSS	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Einstellung des pH	J.T. Baker, Deventer, Holland
Hefeextrakt	Bakterienkultur	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Immu-Mount	Einbettmedium für Immunfluoreszenzfärbung	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Insulin/Transferrin/Selen A	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Zellkultur, <i>Western Blot</i>	J.T. Baker, Deventer, Holland
Kanamycin-Sulfat	Bakterienkultur	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
KCl	Bakterienkultur	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Liothyronin	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lipidkonzentrat	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamine™ 2000	Transfektion	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	<i>Western Blot</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
MEM-nichtessentielle Aminosäuren	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MEM-Vitaminlösung	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Immunfluoreszenzfärbung	J.T. Baker, Deventer, Holland
MgCl <sub>2</sub>	Bakterienkultur	J.T. Baker, Deventer, Holland



MgSO <sub>4</sub>	Klonierung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskopöl	Immunfluoreszenzfärbung	
NaCl	Bakterienanzucht	J.T. Baker, Deventer, Holland
NaOH	Einstellung des pH	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumacid	Immunfluoreszenzfärbung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Opti-MEM	Transfektion	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Immunfluoreszenzfärbung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Zellkultur	Biochrom, Berlin, Deutschland
Pepton aus Casein	Bakterienanzucht	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> (PBS +/+)	Zellkultur	Biochrom, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> (PBS -/-)	Zellkultur	Biochrom, Berlin, Deutschland
Poly-L-Lysin	Zellkultur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat (Tween 20)	<i>Western Blot</i> , Immunfluoreszenzfärbung	Merck Bioscience Ltd., Darmstadt, Deutschland
Ponceau-S	<i>Western Blot</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Rattenschwanzkollagen	Zellkultur	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Rinderhypophysenextrakt	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SDS	<i>Western Blot</i>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
SeeBlue® Plus 2 Prestained Marker	SDS-Page	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
S-MEM	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin Cy3-Konjugat	Oberflächenbiotinylierung	Molecular probes, Eugene, USA

Sulfo-NHS-SS-Biotin	Immunfluoreszenzfärbung	Pierce/ Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
TEMED	<i>Western Blot</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tris-Base	<i>Western Blot</i>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Kultur aller Zelllinien außer NRC	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA (NRC)	Kultur von NRC	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsininhibitor	Zellkultur	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	<i>Western Blot</i>	Merck Bioscience Ltd., Darmstadt, Deutschland
Wasser HPLC rein	Sequenzierung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

In Tabelle 5 sind die verwendeten Enzyme aufgelistet.

**Tabelle 5: Liste der Enzyme**

Enzym	Hersteller
BD Adventage™ 2 Polymerase Mix	BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland
Dpnl	New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland
Pfu-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland

In Tabelle 6 sind die verwendeten Antikörper aufgelistet.

**Tabelle 6: Liste der Antikörper**

Antikörper	Organismus	Hersteller
anti-Claudin 1	Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-Claudin 2	Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-Claudin 3	Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-Claudin 4	Maus	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-Claudin 5	Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

anti-Claudin 5	Maus	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-FLAG	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
anti-FLAG-M2	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
anti-GAPDH	Maus	Biogenesis, Poole, England
anti-GST (GST-2)	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
anti-JAM-1	Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-Kaninchen AlexaFluor-488-Konjugat	Ziege	Molecular probes, Eugene, USA
anti-Kaninchen Cy3-Konjugat	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-Kaninchen Cy5-Konjugat	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-Kaninchen HRP-Konjugat	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-Maus AlexaFluor-488-Konjugat	Ziege	Molecular probes, Eugene, USA
anti-Maus Cy3-Konjugat	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-Maus Cy5-Konjugat	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-Maus HRP-Konjugat	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-Occludin	Maus	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-Occludin	Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-ZO-1	Maus	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-ZO-1	Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti- $\beta$ -Aktin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

In Tabelle 7 sind die verwendeten Kits aufgelistet.

**Tabelle 7: Liste der Kits**

Name	Verwendungszweck	Hersteller
BCA <sup>TM</sup> Protein Assay Kit	Bestimmung der Proteinkonzentration	Pierce/ Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Cell Line Nucleofector <sup>®</sup> Kit L	Transfektion von MDCK-I- und MDCK-II-Zellen	Amata Biosystems, Köln, Deutschland

Cell Line Nucleofector® Kit T	Transfection von Caco-2-Zellen	Amaxa Biosystems, Köln, Deutschland
<i>Microvascular Endothelial Cell Medium-2</i> (EGM2-MV)	Zellkultur	Clonetics, Cambrex BioScience, Wokingham, England
MiniElute® Gel Extraction Kit	Isolation von DNA aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden, Deutschland
MycoAlert® Mycoplasma Detection Assay	Test auf Mykoplasmenkontamination	Lonza, Köln, Deutschland
Qiagen® Plasmid Maxi Kit	Isolation von Plasmid-DNA	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen® Plasmid Midi Kit	Isolation von Plasmid-DNA	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen® Plasmid Mini Kit	Isolation von Plasmid-DNA	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Isolation von Plasmid-DNA	Qiagen, Hilden, Deutschland
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Isolation von Plasmid-DNA	Zymo Research, Orange, USA

In Tabelle 8 sind Medien und Zusätze für Bakterien- und eukaryotische Zellkultur aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 8: Liste der Medien und Zusätze für Bakterien- und eukaryotische Zellkultur**

Bezeichnung	Verwendungszweck/Zusammensetzung
Ca <sup>2+</sup> -Mangelmedium	Zellkulturmedium für <i>calcium switch assay</i> : S-MEM, 10 % (v/v) kalziumfreies FCS, 1 % (v/v) L-Alanyl-L-Glutamin, 100 U Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin
Caco-2-Standardmedium	DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) L-Alanyl-L-Glutamin, 100 U Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin
Einfriermedium	Medium für die Kryokonservierung eukaryotischer Zellen: 50 % (v/v) DMEM, 40 % (v/v) FCS, 9 % (v/v) DMSO, 100 U Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin
hCMEC/D3-Standardmedium	<i>Microvascular Endothelial Cell Medium-2</i> mit 2,5 % (v/v) FCS, 0,025 % (v/v) vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, 0,025 % (v/v) insulinähnlicher Wachstumsfaktor, 0,025 % (v/v) epidermaler Wachstumsfaktor, 0,1 % (v/v) Fibroblastenwachstumsfaktor 2, 0,01 % (v/v) Hydrocortison, 0,025 % (v/v) Ascorbat, 0,025 % (v/v) Gentamycin
HEK-293-Standardmedium	DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) L-Alanyl-L-Glutamin, 100 U Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin
LB Agar	Agarplatte zur Selektion einzelner Klone: LB-Medium mit 20 g/l Agar-Agar
Luria-Bertani (LB) Vollmedium	Standardmedium für Anzucht von <i>E. coli</i> : 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Pepton

	aus Casein; pH-Wert 7,5 mit NaOH
MDCK-II-Standardmedium	DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) L-Alanyl-L-Glutamin, 100 U Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin
MDCK-I-Standardmedium	MEM mit 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) L-Alanyl-L-Glutamin, 100 U Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin
NRC-Standardmedium	DMEM/HAMS F12, 5 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Insulin/Transferrin/Selen A, 1 % (v/v) Lipidkonzentrat, 1 % (v/v) MEM-Vitaminlösung, 2 mM Penicillin/Streptomycin/L-Glutamine, 100 µM MEM nicht essentielle Aminosäuren, 50 µg/ml Trypsininhibitor, 30 µg Rinderhypophysenextrakt, 20 µg/ml Gentamycin, 4,1 µg/ml Forskolin, 3,4 µg/ml Liotyrosin, 393 ng/ml Dexamethason, 25 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor
SOC-Medium	Vollmedium zur Anzucht transformierter <i>E. coli</i> : 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton aus Casein, pH-Wert 7,0 mit NaOH, nach Autoklavieren wurden 20 mM sterile Glukose zugegeben
Trypsin/EDTA	Lösung zum Ablösen adhärenter Zelllinien: 0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS -/-

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Ortsspezifische Mutagenese

Als Ausgangskonstrukt für die Mutagenese-PCR diente der pEYFP-N1-Vektor, der ein FLAG-Cld5-Insert enthielt (pEYFP-N1•FLAG-Cld5). Da das Stoppcodon am 3'-Ende der Cld5-Sequenz fehlte, kodierte dieses Ausgangskonstrukt für ein FLAG-Cld5-YFP-Fusionsprotein. Für die Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit sollte jedoch lediglich ein FLAG-Cld5-Protein genutzt werden. Um die Translation der YFP-Sequenz zu verhindern, wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese ein Stoppcodon an das 3'-Ende der Cld5-Sequenz kloniert (pEYFP-N1<sub>stopp</sub>•FLAG-Cld5<sub>wt</sub>).

Um die Bedeutung einzelner Aminosäuren in der 2. EZS von Cld5 für die parazelluläre Dichtigkeit zu untersuchen, wurden anschließend in diesem neuem Konstrukt definierte Aminosäuren der 2. EZS mittels ortsspezifischer Mutagenese durch andere Aminosäuren ersetzt. Die Grundlage für die Auswahl der Kandidatenamino-säuren bildeten Untersuchungen zu homophilen Interaktionen von Cld5 in HEK-293-Zellen [Piontek, 08]. Für jede Mutagenese wurde ein Primerpaar entworfen, dessen Sequenz im Vergleich zum Cld5<sub>wt</sub> im Bereich der zu mutierenden Aminosäure drei bzw. vier Punktmutationen enthielt (Ta-

belle 9). Die Primer wurden mit der Software MutaPrimer Version 1.0 (Primer Biosoft International, Palo Alto, USA) entworfen und von der Firma BioTeZ (Berlin, Deutschland) synthetisiert.

**Tabelle 9: Durch ortsspezifische Mutagenese hergestellte pEYFP-N1stopp•FLAG-Cld5-Konstrukte.** Die eingeführten Punktmutationen sind fettgedruckt.

Fusionsprotein	Bezeichnung des Plasmids	Ausgangsvektor	Primersequenz (5' → 3')
FLAG-Cld5 <sub>wt</sub>	pEYFP-N1 <sub>stopp</sub> •FLAG-Cld5 <sub>wt</sub>	pEYFP-N1_FLAG-Cld5	AGAAGA ACTATGT <b>CTA</b> AGGATC CACCGGTCG  ACCGGTGGATCCT <b>TTAG</b> ACATAG TTCTTCTTG
FLAG-Cld5 <sub>R145A</sub>	pEYFP-N1 <sub>stopp</sub> •FLAG-Cld5 <sub>R145A</sub>	pEYFP-N1 <sub>stopp</sub> •FLAG-Cld5 <sub>wt</sub>	CAACATCGTTGT <b>CGCC</b> GAGTTC TATGATC  GATCATAGAACT <b>CGGC</b> GACAACGA GTTG
FLAG-Cld5 <sub>Y148A</sub>	pEYFP-N1 <sub>stopp</sub> •FLAG-Cld5 <sub>Y148A</sub>	pEYFP-N1 <sub>stopp</sub> •FLAG-Cld5 <sub>wt</sub>	AACATCGTTGTCCGCGAGTT <b>CG</b> <b>CT</b> GATCCGACGGTGCCGGTGTC A  TGACACCGGCACCGTCGGAT <b>CA</b> <b>GCG</b> AACTCGCGGACAACGATGT T
FLAG-Cld5 <sub>K157A</sub>	pEYFP-N1 <sub>stopp</sub> •FLAG-Cld5 <sub>K157A</sub>	pEYFP-N1 <sub>stopp</sub> •FLAG-Cld5 <sub>wt</sub>	CGACGGTGCCGGTGTCACAG <b>GC</b> <b>AT</b> ACGAGCTGGGCGCGGCGCTG  CAGCGCCGCGCCCAGCTCGTAT <b>GC</b> CTGTGACACCGGCACCGTCG
FLAG-Cld5 <sub>Y158A</sub>	pEYFP-N1 <sub>stopp</sub> •FLAG-Cld5 <sub>Y158A</sub>	pEYFP-N1 <sub>stopp</sub> •FLAG-Cld5 <sub>wt</sub>	GTGTCACAGAAG <b>GCCG</b> AGCTGG GCGCG  CGCGCCCAGCT <b>CGG</b> CCTTCTGT GACAC
FLAG-Cld5 <sub>E159Q</sub>	pEYFP-N1 <sub>stopp</sub> •FLAG-Cld5 <sub>E159Q</sub>	pEYFP-N1 <sub>stopp</sub> •FLAG-Cld5 <sub>wt</sub>	GTCACAGAAGTAC <b>CAG</b> CTGGGC GCGGCG  CGCCGCGCCCAG <b>CTG</b> GTA CTTC TGTGAC

Für jede Mutagenese-PCR wurden zwei Ansätze hergestellt (Tabelle 10). Ansatz 1 enthielt den Vorwärtsprimer und Ansatz 2 enthielt den Rückwärtsprimer.

**Tabelle 10: Reaktionsansätze für Mutagenese-PCR**

<b>Ansatz 1</b>		<b>Ansatz 2</b>	
<b>Volumen</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>	<b>Reagenz</b>
0,5 µl	60 ng Plasmid-DNA	0,5 µl	Plasmid-DNA (60 ng)
1,5 µl	10 x PCR-Reaktionspuffer	1,5 µl	10 x PCR-Reaktionspuffer
1,9 µl	5 µM Vorwärtsprimer	1,9 µl	5 µM Rückwärtsprimer
0,3 µl	10 mM dNTPs	0,3 µl	10 mM dNTPs
10,5 µl	H <sub>2</sub> O (HPLC rein)	10,5 µl	H <sub>2</sub> O (HPLC rein)
0,3 µl	2,5 U/µl Advantage <sup>TM</sup> 2 Polymerase	0,3 µl	2,5 U/µl Advantage <sup>TM</sup> 2 Polymerase
15,0 µl	Gesamtvolumen	15,0 µl	Gesamtvolumen

Zunächst wurden beide Reaktionsansätze getrennt voneinander nach dem gleichen Temperaturregime inkubiert (Tabelle 11). Nach Hitzedenaturierung der Matrizen-DNA bei 95 °C erfolgte das Binden der Primer bei 65 °C. Anschließend synthetisierte die Advantage<sup>TM</sup> 2 Polymerase (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland) bei 68 °C komplementäre DNA. Die komplementäre DNA unterschied sich von der Matrizen-DNA hinsichtlich der Punktmutationen im Primer.

Anschließend wurden beide Reaktionsansätze und damit Vorwärts- und Rückwärtsprimer vereinigt. Nach Zugabe weiterer 0,3 µl Advantage<sup>TM</sup> 2 Polymerase wurde der vereinigte Ansatz einer zweiten PCR-Reaktion unterzogen, deren Temperaturprotokoll sich von dem der ersten PCR-Reaktion unterschied (Tabelle 11).

Tabelle 11: Reaktionsansätze und Temperaturregime für Mutagenese-PCR

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Inkubationszeit
<b>PCR 1 (getrennte Reaktionsansätze)</b>			
Denaturierung	1	95 °C	2 min
Denaturierung		95 °C	30 s
Annealing	5	65 °C	45 s
Elongation		68 °C	10 min
	1	10 °C	∞
<b>PCR 2 (vereinigter Reaktionsansatz)</b>			
Denaturierung	1	95 °C	30 s
Denaturierung		95 °C	30 s
Annealing	17	62,5 °C	1 min
Elongation		68 °C	10 min
Elongation	1	68 °C	20 min
	1	4 °C	∞

Nach der zweiten PCR wurden die Reaktionsansätze mit 20 U DpnI (New England Bio-Labs, Frankfurt a. M., Deutschland) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. DpnI katalysiert die Hydrolyse methylierter DNA [Vovis, 77]. Folglich wurden die parentalen, methylierten DNA-Moleküle, die die keine Punktmutationen enthielten, hydrolysiert und aus dem Reaktionsansatz entfernt. Die neusynthetisierten, nicht methylierten DNA-Moleküle hingegen, blieben im Reaktionsansatz erhalten. Diese Plasmide wurden anschließend in kompetente *E. coli*s transformiert (2.2.2). Die Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt (2.2.9).

## 2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA

Die verwendeten Plasmide wurden in chemisch oder elektrisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen transformiert.

Für eine Transformation in chemisch kompetente *E. coli*s vom Stamm DH5α (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden 100 µl Aliquots Bakteriensuspension, die bei -80 °C gelagert wurden, auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2 - 4 µl Plasmid-DNA in den



Transformationsansatz pipettiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien zunächst 45 s bei 42 °C inkubiert (Hitzeschock) und danach 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurde die Bakteriensuspension 1 h bei 37 °C in einem Brutschrank geschüttelt (TH15, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland). Anschließend wurden 75 und 150 µl der Suspension mit einem Drigalski-Spatel auf vorgewärmten, kanamycinhaltigen Agarplatten, die für die Selektion von Plasmid und Bakterienstamm geeignet sind, ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Elektrokompetente *E. coli*s vom Stamm DH5α wurden gemäß Sambrock 1989 hergestellt. Für eine Transformation wurden 100 µl der Bakterien, die bei - 80 °C gelagert wurden, auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2 - 4 µl Plasmid-DNA in die Suspension pipettiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz in eine 1 mm Elektroporationsküvette (EquiBio, Peqlab, Erlangen, Deutschland) überführt und die Elektroporation bei 1800 V im EasyjecT prima (EquiBio/Thermo Electron, Milford, MA, USA) durchgeführt. Nach Zugabe von 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium wurde die Bakteriensuspension 1 h bei 37 °C in einem Heizblock geschüttelt. Anschließend wurden 75 und 150 µl der Suspension mit einem Drigalski-Spatel auf vorgewärmten, kanamycinhaltigen Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde mittels Kolonie-PCR (2.2.3) überprüft, ob die gewachsenen Klone mit der Plasmid-DNA transformiert wurden.

### **2.2.3 Kolonie-PCR**

Mittels Kolonie-PCR wurde sichergestellt, dass ausschließlich Klone, die pEYFP-N1<sub>stopp</sub>•FLAG-Cld5 enthielten, für eine Sequenzierung eingesetzt wurden. Die Klone wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze in ein Eppendorf-Gefäß mit 100 µl LB-Medium überführt und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde 1 µl dieser Suspension als Matrize für eine PCR eingesetzt, in der pEYFP-N1<sub>stopp</sub>•FLAG-Cld5 mit Primern nachgewiesen wurden, die mit der FLAG-Cld5 Sequenz und dem pEYFP-Vektor hybridisierten (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Primersequenzen, Reaktionsansatz und Inkubationsprotokoll der Kolonie-PCR**

Primersequenzen (5' → 3)		
Vorwärtsprimer	AAAGCTGACATGGATTATAAAGATGATGATGATAAAATGGGGTCTGCA GCGTTGGAAATTCTGG	
Rückwärtsprimer	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG	
Reaktionsansatz		
Volumen	Reagenz	
0,5 µl	60 ng Plasmid-DNA	
1,5 µl	10 x PCR-Rektionspuffer	
0,2 µl	50 µM Vorwärtsprimer	
0,2 µl	50 µM Rückwärtsprimer	
0,3 µl	10 mM dNTPs	
11,8 µl	H <sub>2</sub> O (HPLC rein)	
0,5 µl	Taq-DNA-Polymerase oder Pfu-Polymerase	
15 µl	Gesamtvolumen	
Inkubationsprotokoll		
Zyklenzahl	Temperatur	Zeit
1	94 °C	4 min
	94 °C	30 sec
	60 °C	45 sec
	72 °C	1 min
	72 °C	5 min
25		
1	4 °C	∞

## 2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Das Reaktionsprodukt der Kolonie-PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Zur Probenvorbereitung wurden 1 µl des Kolonie-PCR-Reaktionsansatzes mit 2 µl 6 x DNA-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und 9 µl H<sub>2</sub>O versetzt. Die Proben wurden in die Taschen eines 1 % Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 180 V. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Um die Größe der doppelsträngigen DNA-Moleküle abzuschätzen, wurde der 1 kb DNA-Größenmarker (Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Deutschland) auf jedem Gel auf-

getrennt. Den Gelen wurden 3 µl Ethidiumbromidlösung/100 ml Gel zugesetzt. Ethidiumbromid interkalierte in die Basen der DNA. Der interkalierte Farbstoff wurde durch UV-Licht mit  $\lambda = 312$  nm angeregt und emittierte Licht mit  $\lambda = 590$  nm, so dass die DNA-Banden fotografiert werden konnten (Agarosegeldokumentationssystem BioDoc, Biometra, Göttingen, Deutschland).

### **2.2.5 Minipräparation von Plasmid-DNA**

Mit einer Minipräparation wurden bis zu 25 µg Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli*s isoliert. Dafür wurden auf Agarplatten gewachsene Klone (2.2.4) mit einer Pipettenspitze in ein Falconröhrchen mit 3,5 ml kanamycinhaltigem LB-Medium überführt. Die Suspension wurde über Nacht bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Am folgenden Tag wurde die Suspension 10 min bei 4.000 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 600 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Zippy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Orange, USA) isoliert. Dabei wurden die Bakterien durch Zugabe von 100 µl 7 x Lysepuffer aufgeschlossen. Das Bakterienlysate wurde mit 250 µl 4 °C kaltem Neutralisationspuffer versetzt. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 13.000 x g und 25 °C wurde der Überstand mit der Plasmid-DNA auf eine Säule pipettiert. Durch erneutes Zentrifugieren für 1 min bei 13.000 x g und 25 °C wurde die Plasmid-DNA an die Säule gebunden. Um Zellmaterial, das neben der Plasmid-DNA an die Säule gebunden hatte, zu entfernen, wurden zunächst 200 µl Endo-Wasch-Puffer und anschließend 400 µl Wasserpuffer jeweils 1 min mit 13.000 x g bei 25 °C durch die Säule zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde von der Säule gelöst, indem 30 µl Elutionspuffer 1 min mit 13.000 x g bei 25 °C durch die Säule zentrifugiert wurden. Nach der Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration (2.2.8) wurde das Eluat bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **2.2.6 Midipräparation von Plasmid-DNA**

Mit einer Midipräparation wurden bis zu 200 µg Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli*s isoliert. Dafür wurden zunächst 2,5 ml kanamycinhaltiges LB-Medium mit 1 µl Glycerolstock angeimpft. Diese Vorkultur wurde 8 h bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl der Vorkultur in 50 ml kanamycinhaltiges LB-Medium über-

führt. Diese Hauptkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Midiprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Das dabei gewonnene Plasmid-DNA-Pellet wurde in 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach der Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration (2.2.8) wurde die gelöste DNA bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

### 2.2.7 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Um bis zu 500 µg Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli*s zu isolieren, wurde eine Maxipräparation mit dem Maxiprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden analog zur Midipräparation (2.2.4) eine Vor- und Hauptkultur hergestellt. Im Unterschied zur Midipräparation wurden zur Herstellung der Vorkultur 5 ml kanamycinhaltiges LB-Medium verwendet und zum Ansetzen der Hauptkultur 300 µl der Vorkultur in 150 ml kanamycinhaltiges LB-Medium pipettiert. Das durch die Maxipräparation gewonnene Plasmid-DNA-Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach der Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration (2.2.8) wurde die gelöste DNA bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

### 2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

In einer Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm wurden geeignete Verdünnungen der Plasmid-DNA-Proben in dH<sub>2</sub>O hergestellt und die optische Dichte bei λ = 260 nm gegen dH<sub>2</sub>O als Leerwert gemessen. Da eine wässrige Lösung, die 50 µg/ml doppelsträngige DNA enthält, unter diesen Bedingungen eine OD<sub>260</sub> von 1 besitzt, wurde die Plasmid-DNA-Konzentration der Proben nach folgender Formel berechnet:

$$[\text{DNA}] = \text{OD}_{260} \cdot \text{VF} \cdot \epsilon \cdot d$$

[DNA]: Konzentration der Plasmid-DNA in µg/ml

OD<sub>260</sub>: optische Dichte bei λ = 260 nm

VF: Verdünnungsfaktor

ε: Absorptionskoeffizient doppelsträngiger DNA (50 µg/ml·cm)

d: Schichtdicke der Küvette in cm = 1 cm

## 2.2.9 DNA-Sequenzierung

DNA-Proben wurden mit dem *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) sequenziert. Der gewünschte DNA-Bereich wurde zunächst durch eine Sequenzierungs-PCR amplifiziert. Dafür wurden 200 ng Plasmid-DNA, 4 - 6 pmol Sequenzierungsprimer (Tabelle 13), 1 µl *Big Dye Reaction Mix*, 1,5 µl 5 x Reaktionspuffer mit HPLC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt und wie in Tabelle 14 dargestellt inkubiert.

**Tabelle 13: Sequenzierungsprimer**

Bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
pEGFP-MCS590	GGTTTAGTGAACCGTCAGATCC
pEGFP-N1 <sub>rev</sub>	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG

**Tabelle 14: Inkubationsprotokoll der Sequenzierungs-PCR**

Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
25	96 °C	10 s
	50 °C	5 s
	60 °C	4 min
1	4 °C	∞

Das Produkt der Sequenzierungs-PCR wurde durch 15 min Inkubation mit 42,5 µl Fällungsreagenz (112,5 mM Na-Acetat, 76 % (v/v) Ethanol in H<sub>2</sub>O, HPLC rein) bei RT gefällt. Der Ansatz wurde 20 min bei 20.000 x g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 20.000 x g und RT wurde das Pellet in der SpeedVac DNA 110 (Savant, Thermo Scientific, Bonn, Deutschland) getrocknet. Die Sequenzierung wurde von der Sequenzierabteilung des Leibniz-Instituts für Molekulare Pharmakologie (Berlin, Deutschland) bzw. vom Sequenzierungsservice der Firma Invitek GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenz des PCR-Produkts wurde anschließend über die *blast2sequences* Funktion der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) auf Richtigkeit überprüft.

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die MDCK-I-Zellen (*Madin Darby canine kidney cells*, Linie I) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Michael Fromm (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Sie wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (v/v) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Als Kulturmedium diente MDCK-I-Standardmedium. Das Kulturmedium wurde alle drei bis vier Tagen gewechselt. Die Zellen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:10 gesplittet. Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS -/- gewaschen und 10 bis 15 min mittels Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C abgelöst (0,5 bzw. 1,5 ml Trypsin/EDTA für 25 bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäße). Durch Zugabe von MDCK-I-Standardmedium wurde das Trypsin inhibiert (3,0 bzw. 8,5 ml MDCK-I-Standardmedium für 25 bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäße). Die resuspendierten Zellen wurden anschließend im Verhältnis 1:10 in neue, unbeschichtete Zellkulturgefäße (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät.

Die MDCK-II-Zellen (*Madin Darby canine kidney cells*, Linie II) wurden freundlicherweise von der EPO-GmbH (Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> (v/v) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Als Kulturmedium diente MDCK-II-Standardmedium. Das Kulturmedium wurde alle drei bis vier Tagen gewechselt. Die Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:10 gesplittet. Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS -/- gewaschen und 10 bis 15 min mittels Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37 °C abgelöst (0,5 bzw. 1,5 ml Trypsin/EDTA für 25 bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäße). Durch Zugabe von MDCK-II-Standardmedium wurde das Trypsin inhibiert (3,0 bzw. 8,5 ml MDCK-II-Standardmedium für 25 bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäße). Die resuspendierten Zellen wurden anschließend im Verhältnis 1:10 in neue, unbeschichtete Zellkulturgefäße (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät.

HEK-293-Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie) wurden bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> (v/v) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Als Kulturmedium diente HEK-293-Standardmedium. Das Kulturmedium wurde alle drei bis vier Tagen gewechselt. Die Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS -/- gewaschen und in 5 min mittels Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C abgelöst (0,5 bzw. 1,0 ml Trypsin/EDTA für 25 bzw.

75 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäße). Durch Zugabe von HEK-293-Standardmedium wurde das Trypsin inhibiert (3,0 bzw. 8,5 ml HEK-293-Standardmedium für 25 bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäße). Die resuspendierten Zellen wurden anschließend im Verhältnis 1:5 in neue, Poly-L-Lysin beschichtete Cellstar® Zellkulturgefäße (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät.

Caco-2-Zellen (humane Darmkrebszelllinie) wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (v/v) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Als Kulturmedium diente Caco-2-Standardmedium. Das Kulturmedium wurde im Abstand von drei bis vier Tagen gewechselt. Die Zellen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS -/- gewaschen und innerhalb von 10 min mit Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C abgelöst (0,5 bzw. 1,5 ml Trypsin/EDTA für 25 bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäße). Durch Zugabe von Caco-2-Standardmedium wurde das Trypsin inhibiert (3,0 bzw. 8,5 ml Caco-2-Standardmedium für 25 bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäße). Die resuspendierten Zellen wurden anschließend im Verhältnis 1:10 in neue, unbeschichtete Zellkulturgefäße (Corning, Berlin, Deutschland) ausgesät.

NRC (Gallengangepithelzelllinie aus der Ratte) wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (v/v) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Als Kulturmedium diente NRC-Standardmedium. Das Kulturmedium wurde im Abstand von drei bis vier Tagen gewechselt. Die Zellen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:3 gesplittet. Dafür wurden die Zellen einmal mit PBS -/- gewaschen und anschließend in 8 ml PBS -/- 2 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 15 min mit 2 ml Trypsin/EDTA (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) von einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche bei 37 °C abgelöst. Durch Zugabe von NRC-Standardmedium wurde das Trypsin inhibiert. Die resuspendierten Zellen wurden anschließend im Verhältnis 1:3 in neue, mit Rattenschwanzkollagen beschichtete Cellstar® Zellkulturgefäße (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Für die Beschichtung wurde eine Lösung aus 0,66 mg/ml Rattenschwanzkollagenlösung in 0,2 % steriler Essigsäure verwendet. 40 µl dieser Lösung wurden gleichmäßig in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche verteilt und unter der Sterilbank getrocknet.

hCMEC/D3 (humane Gehirnkapillarendothelzelllinie) wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> (v/v) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Als Kulturmedium diente hCMEC/D3-Standardmedium. Das Kulturmedium wurde im Abstand von drei bis vier

Tagen gewechselt. Die Zellen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:5 gesplittet. Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS +/- gewaschen und in 5 min mit Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland) abgelöst (0,5 bzw. 1,5 ml Trypsin/EDTA für 25 bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäße). Durch Zugabe von hCMEC/D3-Standardmedium wurde das Trypsin inhibiert (3,0 bzw. 8,5 ml DMEM für 25 bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäße). Die resuspendierten Zellen wurden anschließend im Verhältnis 1:5 in neue, mit Rattenschwanzkollagen beschichtete Cellstar<sup>®</sup> Zellkulturgefäße (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Die Beschichtung der Zellkulturgefäße erfolgte wie bei den NRC.

### **2.3.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zelllinien**

Um stabil transfizierte MDCK-II-Zellklone vergleichbarer Passagezahl zu erhalten, wurden diese zunächst expandiert und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden nach den unter 2.3.1 beschriebenen Methoden abgelöst, in DMEM aufgenommen und in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurden die Zellen 5 min bei 260 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3,75 ml Einfriermedium aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden zu je 750 µl auf fünf Kryoröhrchen aufgeteilt. Diese wurden über Nacht in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei - 80 °C gelagert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff (Chronos<sup>®</sup>, Cryotherm, Euteneuen, Deutschland) gelagert.

Um eingefrorene Zelllinien wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, umgehend bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in eine mit dem jeweiligen Standardmedium gefüllte 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Nach Adhäsion der Zellen wurde das Medium gewechselt, um das DMSO des Einfriermediums zu entfernen.

### **2.3.3 Zellzahlbestimmung**

Um Experimente mit eukaryotischen Zelllinien reproduzierbar durchzuführen, wurden die Zellzahl mit dem CASY<sup>®</sup> 1 Zellzählssystem (Schärfe Systems, Reutlingen) bestimmt. Dafür wurden die Zellen, wie unter 2.3.1 beschrieben, abgelöst und anschließend wieder im jeweiligen Standardmedium aufgenommen. Für die Zellzählung wurden drei 25 µl Ali-



quots dieser Zell-Medium-Suspension abgenommen. Jedes Aliquot wurde in je ein Zählröhrchen mit 10 ml Casyton® überführt. Die Anzahl der Zellen in jedem Röhrchen wurde dreimal bestimmt, wobei nur Signale zwischen 10 und 30  $\mu\text{m}$  als Zellen angesehen wurden. Die neun Einzelwerte wurden gemittelt. Aus dem Mittelwert wurde die Zellkonzentration (Zellzahl/ml) berechnet.

#### **2.3.4 Mykoplasmentest**

Um mykoplasmenfreie Zellkulturbedingungen zu gewährleisten, wurden alle Zelllinien in regelmäßigen Abständen auf einen möglichen Befall durch Mykoplasmen untersucht. Dafür wurde der MycoAlert® Mycoplasma Detection Assay (Lonza, Wuppertal, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

#### **2.3.5 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zelllinien**

Für die transiente Transfektion eukaryotischer Zellen wurden 100.000 Zellen in jedes *Well* einer 24-*Well*-Zellkulturschale eingesät. Am folgenden Tag wurde das jeweilige Standardmedium 4 h vor der Transfektion gegen antibiotikumfreies Medium mit 5 % FCS ausgetauscht. Für jede Transfektion wurden in einem Ansatz 4  $\mu\text{g}$  DNA und 250  $\mu\text{l}$  Opti-MEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sowie in einem zweiten Ansatz 10  $\mu\text{l}$  Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 250  $\mu\text{l}$  Opti-MEM 5 min inkubiert. Danach wurde der erste Ansatz vorsichtig in den zweiten überführt. Nach 20 min wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Sechs Stunden nach der Transfektion oder am folgenden Morgen erfolgte ein Wechsel zum jeweiligen Standardmedium (2.3.1).

Für die Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurden die DNA-Konstrukte mittels Lipofektion oder Elektroporation in die Zellen eingebracht. Zur stabilen Transfektion mittels Lipofektion wurden 500.000 NRC, hCMEC/D3, MDCK-I-, MDCK-II- oder Caco-2-Zellen in einem 6er-*Well* im jeweiligen Standardmedium ausgesät. Am folgenden Tag wurde das jeweilige Standardmedium 4 h vor der Transfektion gegen 2 ml antibiotikumfreies Medium mit 5 % FCS ausgetauscht. Für jede Transfektion wurden in einem Ansatz 4  $\mu\text{g}$  DNA und 250  $\mu\text{l}$  Opti-MEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sowie in einem zweiten Ansatz 10  $\mu\text{l}$  Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 250  $\mu\text{l}$  Opti-

MEM 5 min inkubiert. Danach wurde der erste Ansatz vorsichtig in den zweiten überführt. Nach 20 min wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Sechs Stunden nach der Transfektion oder am folgenden Morgen erfolgte ein Mediumwechsel zum Standardmedium (2.3.1).

Zur stabilen Transfektion mittels Elektroporation wurde für MDCK-I-Zellen das Cell Line Nucleofector® Kit L oder für MDCK-II- und Caco-2-Zellen das Kit T (beide Amaxa, Köln, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

### **2.3.6 Herstellung stabil transfizierter eukaryotischer Zelllinien**

Um eine Zellkultur mit einem möglichst hohen Anteil transfizierter Zellen zu erhalten, wurden die Zellen drei Tage nach der Transfektion im jeweiligen Standardmedium kultiviert, dem das Selektionsantibiotikum G418 im Verhältnis 1:100 zugesetzt wurde. Nur transfizierte Zellen verfügten durch den pEYFP-N1-Vektor über eine Resistenz gegen G418 und überlebten im Selektionsmedium. Untransfizierte Zellen wurden innerhalb von zwei Wochen abgetötet. Da jedoch die Transfektion des pEYFP-N1-Vektors nicht in jeder transfizierten Zelle zur Expression des gewünschten Cld5-Proteins führte, wurden die selektierten Zellen zusätzlich vereinzelt. Dafür wurden sie auf 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen ausgesät und einige Tage später nach vorsichtigem Ablösen mit Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit Hilfe eines Wattestäbchens einzeln in 24-Well-Schalen übertragen. Alternativ wurden sie in den Konzentrationen 0,1, 1, 5, 10, 20, 40, 50 und 100 Zellen/Well in eine Klonierungsplatte eingesät. Um klonale Variationen zu minimieren, wurden für jedes FLAG-Cld5-Konstrukt drei unabhängige MDCK-II-Zellklone hergestellt, die eine vergleichbare FLAG-Cld5-Expression aufwiesen. In allen weiteren Untersuchungen wurden die Ergebnisse dieser drei Klone gemittelt und als Wert für das jeweilige FLAG-Cld5-Konstrukt angegeben.

### **2.3.7 Immunfluoreszenzfärbungen**

Für immunhistochemische Detektionen von TJ-Proteinen wurden Zellen in einer Dichte von 200.000 Zellen/ml auf 12 mm Glasplättchen (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) ausgesät. Die Zellen wurden, wie unter 2.3.1 beschrieben, kultiviert. Zwei bis sieben Tage nach der Aussaat wurde das jeweilige Standardmedium entfernt. Die

Zellen wurden zweimal mit PBS -/- gewaschen. Anschließend erfolgten Dehydrierung, Fixierung und Rehydrierung der Zellen für 5 min in Azeton, 1 min in 95 % Ethanol und 1 min in PBS +/+. Anschließend wurden die Zellen 10 min in Blockierungspuffer (1 % BSA, 0,05 % Tween 20 in PBS) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Danach wurden sie 1 h bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert, der in Blockierungspuffer verdünnt wurde. Sollten mehrere Proteine gleichzeitig detektiert werden, wurden die entsprechenden primären AK gemischt. Tabelle 15 fasst die verwendeten Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen zusammen.

**Tabelle 15: Primärantikörper und deren Verdünnungen für Immunfluoreszenzfärbungen**

Primärantikörper	Verdünnung
Kaninchen-anti-Cld1	1:150
Kaninchen-anti-Cld3	1:100
Kaninchen-anti-Cld5	1:300
Kaninchen-anti-FLAG	1:300
Kaninchen-anti-Occludin	1:200
Kaninchen-anti-ZO-1	1:150
Maus-anti-Cld4	1:150
Maus-anti-Cld5	1:100
Maus-anti-FLAG-M2	1:500
Maus-anti-Occludin	1:250
Maus-anti-ZO-1	1:200

Nach dem Entfernen des primären AK wurden die Zellen fünfmal je 2 min mit Blockierungspuffer gewaschen. Anschließend wurden sie 30 min in einer Lösung inkubiert, die 17 µg/ml DAPI und den jeweiligen sekundären AK in geeigneter Verdünnung enthielt (Tabelle 16). Wurden zwei primäre Antikörper eingesetzt, wurden die kognaten sekundären AK ebenfalls gleichzeitig verwendet.

**Tabelle 16: Sekundärantikörper und deren Verdünnungen für Immunfluoreszenzfärbungen**

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-Kaninchen-AlexaFluor-488-Konjugat	1:250
anti-Kaninchen-Cy3-Konjugat	1:250
anti-Kaninchen-Cy5-Konjugat	1:250
anti-Maus-AlexaFluor-488-Konjugat	1:250
anti-Maus-Cy3-Konjugat	1:250
anti-Maus-Cy5-Konjugat	1:250
Streptavidin-Cy3	1:250

Nach dem Entfernen des sekundären AK wurden die Zellen erneut fünfmal je 2 min mit Blockierpuffer gewaschen. Abschließend wurde das Deckgläschen mit Hilfe des Eindeckmediums Immu-Mount (Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland) auf einen Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) geklebt. Die Präparate wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

### **2.3.8 Zelloberflächenbiotinylierung**

Um die subzelluläre Lokalisation der FLAG-Cld5-Proteine in HEK-293-Zellen zu analysieren und dabei zwischen Plasmamembranlokalisation und intrazellulärer Lokalisation unterscheiden zu können, wurde die Plasmamembran der Zellen mit Biotin angefärbt. Dabei bindet Biotin an die freien Aminogruppen der Proteine in der Plasmamembran. Die Zellen wurden zunächst auf Glasplättchen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden sie dreimal mit 4 °C kaltem PBS +/- gewaschen. Anschließend wurden sie 45 min bei 4 °C in Sulfo-NHS-SS-Biotin (0,5 mg/ml) inkubiert. Danach wurden sie zweimal mit 4 °C kaltem 50 mM Glycin-PBS +/- gewaschen, 10 min in der gleichen Lösung inkubiert und ein weiteres Mal gewaschen. Die abschließende Fixierung und Färbung mit einem Streptavidin-Cy3-Antikörper, der hochspezifisch an Biotin bindet, sowie einem anti-Cld5-Antikörper aus dem Kaninchen erfolgte wie unter 2.3.7 beschrieben.

### 2.3.9 Mikroskopische Untersuchungen

Nach der Immunfluoreszenzfärbung wurden die eingedeckelten Zellen an den konfokalen LSM Mikroskopen Meta NLO oder UV ausgewertet. Die Anregungswellenlänge und die Wellenlänge des Detektionsbereichs, die für Detektion des Kernfarbstoffs DAPI sowie der Konjugate der sekundären Antikörper Cy3 und 488 genutzt wurden, sind in Tabelle 17 dargestellt. Mögliche Kontaktanreicherungen wurden mit Hilfe der LSM Software identifiziert.

**Tabelle 17: Parameter für die Detektion von DAPI, Cy3 und 488 und DAPI an konfokalen Mikroskopen**

Farbstoff	Mikroskop	Anregungswellenlänge (nm)	Wellenlänge des Detektionsbereichs (nm)
DAPI	NLO	800	435 – 485
	UV	364	385 – 470
Cy3	NLO, UV	543	> 560
488	NLO, UV	488	500 – 530

### 2.3.10 Filterkulturen

Um den parazellulären Widerstand und parazelluläre Transportprozesse zu messen, wurden Zellen auf mikroskopierbaren Transwell® CM-Filtern und PCF-Filtern (Millipore, Eschborn) mit einer Wachstumsfläche von 0,6 cm<sup>2</sup> (kleine Filter) oder 4,2 cm<sup>2</sup> (große Filter) und einer Porengröße von 0,4 µm ausgesät.

PCF-Filter besitzen bereits eine extrazelluläre Matrix, so dass zahlreiche Zelllinien ohne weitere Beschichtung auf ihnen kultiviert werden können. Desweiteren werden PCF-Filter im Gegensatz zu CM-Filtern vom Hersteller für Permeationsmessungen empfohlen. Allerdings sind PCF-Filter nicht mikroskopierbar, so dass das Wachstum der darauf ausgesäten Zellen nicht optisch verfolgt werden kann.

Die Beschaffenheit der CM-Filter erlaubt zwar die mikroskopische Betrachtung der darauf befindlichen Zellen, erfordert jedoch das Auftragen einer extrazellulären Matrix, damit sich die Zellen anheften können. Daher wurden die CM-Filter mit Rattenschwanzkollagen beschichtet. Dafür wurden 150 µl einer 220 µg/ml Rattenschwanzkollagelösung auf die kleinen Filter und 600 µl dieser Lösung auf die großen Filter aufgetragen. Die Filter wur-

den bei 37 °C auf einer Wärmeplatte unter der Sterilbank getrocknet und vor ihrer Verwendung einmal mit PBS gewaschen.

Um die optimale Startzellzahl zu bestimmen, wurden alle untersuchten Zelllinien in verschiedenen Dichten auf CM-Filtern ausgesät und ihr Wachstum über einen Zeitraum von mindestens einer Woche mikroskopisch beobachtet. Parallel dazu wurde der TER gemessen (2.4.1). Nachfolgend wurden die gleichen Zelldichten auf den PCF-Filtern ausgesät und der TER ermittelt. Für alle untersuchten Zelllinien erwiesen sich unabhängig vom genutzten Filtermaterial 100.000 Zellen für die kleinen bzw. 700.000 Zellen für die großen Filter am geeignetsten. Bei einer höheren Zellkonzentration erreichten die Zellen ihren maximalen TER zwar früher, jedoch war dieser deutlich niedriger und fiel bereits nach wenigen Tagen wieder ab. Wurden weniger Zellen ausgesät, bildeten sie auf den Filtern keinen konfluenten *Monolayer* aus und konnten folglich keinen TER aufbauen.

Nach dem Ermitteln der optimalen Startzellzahl für alle Zelllinien und beide Filtergrößen wurden die Zellen in allen weiteren Versuchen auf PCF-Filtern kultiviert. Die kleinen Filter wurden in 24-*Well*-Schalen und die großen in 6-*Well*-Schalen gelegt. Das Außenvolumen des Kulturmediums betrug bei den kleinen Filtern 600 µl und das Innenvolumen 400 µl. Bei den großen Filtern betrugen die entsprechende Volumina 2 ml und 1,6 ml.

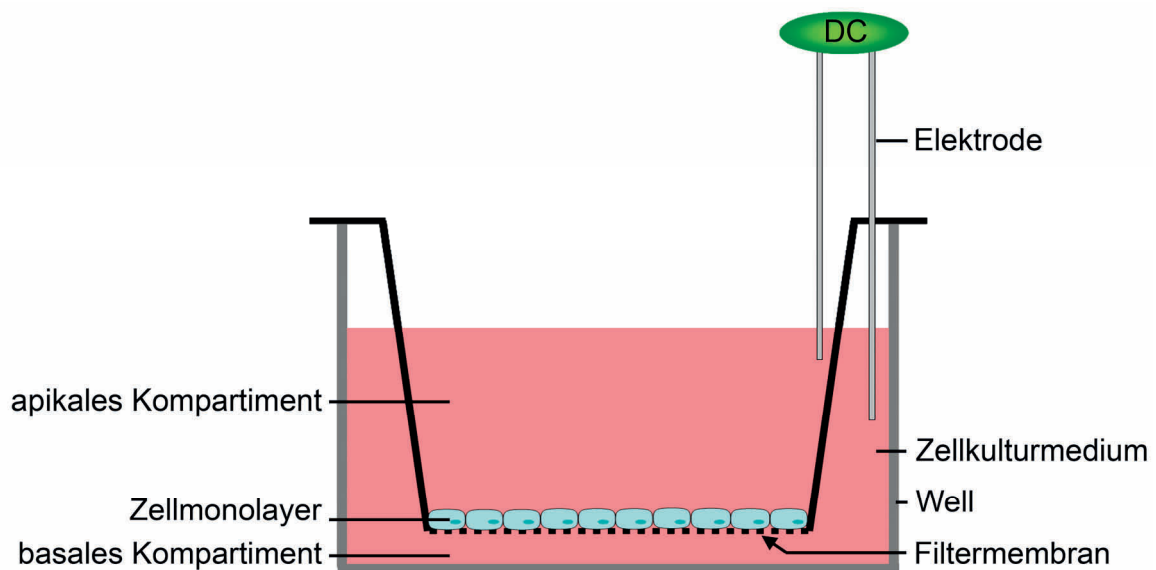
### 2.3.11 Gefrierbruchelektronenmikroskopie

MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, FLAG-Cld5<sub>R145A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> bzw. den Kontrollvektor stabil exprimierten wurden in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen, Schweiz) bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden sie mit PBS+/+ gewaschen und 2 h mit 2,5 % Glutaraldehyd in PBS +/+ in der Zellkulturflasche fixiert. Die Gefrierbruchelektronenmikroskopie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Harmut Wolburg (Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland) gemäß [Mack, 06] durchgeführt.

## 2.4 Messung der parazellulären Dichtigkeit

### 2.4.1 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands im klassischen Filterkultursystem

Drei Tage nach dem Anlegen der Filterkulturen wurde die Konfluenz der Zellen mikroskopisch beurteilt. Enthielt der *Monolayer* keine Löcher, wurde eine TER-Messung durchgeführt. Dafür wurde eine Silber-Silberchlorid-Elektrode (Millipore, Eschborn, Deutschland) über Nacht in 10 mM KCl-Lösung äquilibriert, 10 min in 70 % Ethanol sterilisiert, unter der Sterilbank getrocknet und 10 min in DMEM geeicht. Für die Messung wurde die längere Seite der Silber-Silberchlorid-Elektrode in den Bereich zwischen Filter und Wand der Zellkulturschale gehalten. Die kürzere Seite wurde in das Medium über den Zellen getaucht. Zur Messung des TER wurde die Silber-Silberchlorid-Elektrode mit einem Volt-Ohmmeter Millicell®-ERS (Millipore, Eschborn, Deutschland) verbunden (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung einer TER-Messung im Filterkultursystem**

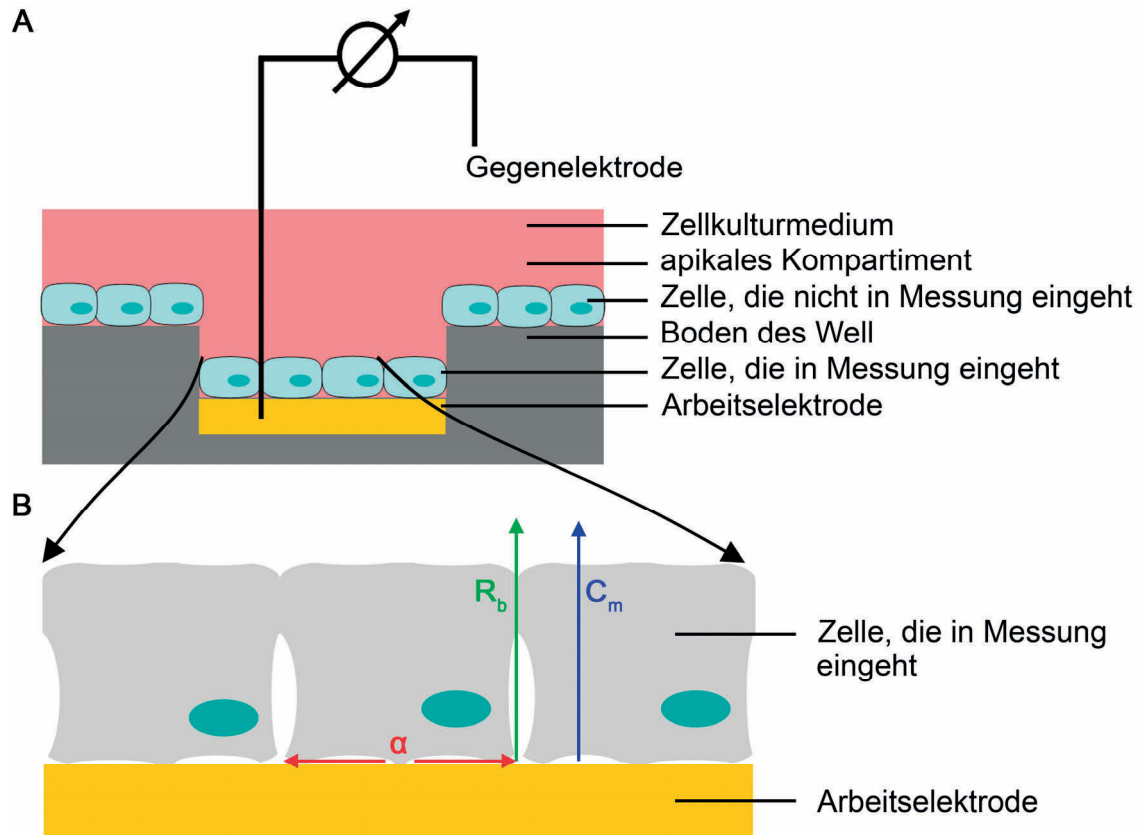
Der TER eines Filters wurde jeweils an drei verschiedenen Stellen gemessen und der Mittelwert berechnet. Da der TER temperaturabhängig ist, wurden alle Messungen bei 37 °C auf einer Wärmeplatte durchgeführt. Zu jedem Experiment wurde mindestens ein zellfreier Filter mitgeführt, um den TER des Filters zu bestimmen. Dieser Wert wurde

vom TER der bewachsenen Filter subtrahiert. Der daraus resultierende TER wurde anschließend mit der Fläche des Zellkulturfilters multipliziert und ergab den TER in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ .

#### **2.4.2 Messung des parazellulären Widerstands im *Electric cell-substrate Impedance Sensing*-System**

Zur Bestimmung des parazellulären Widerstands wurde neben der etablierten TER-Messung mittels Silber-Silberchlorid-Elektrode und Volt-Ohm-Meter (2.4.1) auch das ECIS-System (Applied Biophysics, Model 1600R, New York, USA) angewandt. Diese Technik ermöglicht die biophysikalische Charakterisierung von adhärennten *Monolayern* sowohl hinsichtlich ihres Gesamtwiderstands (Impedanz), ihres parazellulären Widerstands ( $R_b$ ), ihrer Zell-Substrat-Kontakte ( $\alpha$ ) als auch der Membrankapazität ( $C_m$ ) mit hoher zeitlicher Auflösung und ohne Schädigung der Zellen [Giaever, 91]. Dafür wurden die Zellen direkt auf Goldelektroden ausgesät, die auf den Boden der acht *Wells* eines ECIS-Trägers eingelassen waren. Die Fläche dieser so genannten „Arbeitselektroden“ beträgt jeweils  $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$  und ist damit um Faktor 300 kleiner als die der Gegenelektrode ( $0,15 \text{ cm}^2$ ). Dadurch kann die eigene Impedanz der Gegenelektrode vernachlässigt werden. An die Arbeitselektroden wurde eine nicht invasive Spannung angelegt. Die Messwerte wurden fortlaufend durch die Zählelektrode gemessen (Abbildung 8). Es wurden *Wells* mit einer Elektrode sowie zehn oder 40 Elektroden (Ibidi, München, Deutschland) genutzt.





**Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Widerstandsmessung im ECIS-System.** Innerhalb der gemessenen Impedanz wird zwischen dem parazellulären Widerstand  $R_b$  und dem Widerstand  $\alpha$ , der aus der Adhäsion der Zellen an das Substrat resultiert, unterschieden.  $C_m$  bezeichnet die Membrankapazität, die Rückschlüsse auf die Zellmorphologie erlaubt [Giaever, 91].

Da Impedanzmessungen mit Wechselstrom erfolgen und der gemessene Widerstand frequenzabhängig ist, wurde zunächst für jede der verwendeten Zelllinien (MDCK-I, MDCK-II, Caco-2, NRC, hCMEC/D3) über einen Frequenzscan die optimale Frequenz ermittelt. Dafür wurde der parazelluläre Widerstand konfluenter Zellen mit dem parazellulären Widerstand der zellfreien Elektrode bei Frequenzen von 100 - 40.000 Hz verglichen. Als optimaler Frequenzbereich wurde der Bereich ermittelt, in dem der Widerstand ein Plateau erreichte und nicht mehr frequenzabhängig war. Bei NRC, MDCK-I-, MDCK-II- und Caco-2-Zellen wurde der Widerstand bei 400 Hz und bei hCMEC/D3 bei 4.000 Hz aufgezeichnet. Zusätzlich wurden jeweils auch die Widerstände bei 40 kHz gemessen, da diese Werte Hinweise auf die Konfluenz der Zellen lieferten [Wegener, 00].

Für ECIS-Messungen mit hCMEC/D3 und NRC wurden die Böden der *Wells* zuvor mit Rattenschwanzkollagen beschichtet, um ausreichende Adhäsionsmöglichkeiten an eine extrazelluläre Matrix zu schaffen. Dafür wurden 150 µl einer 220 µg/ml Rattenschwanzkollagelösung in die *Wells* pipettiert und nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C entfernt. Anschließend wurden die *Wells* einmal mit PBS gewaschen. Vor einer Messung wurden 200 µl Medium in jedes *Well* vorgelegt und 30 min im Brutschrank bei 37°C äquilibriert. Anschließend wurden die Zellen ausgesät. Für ECIS-Messungen mit NRC, hCMEC/D3, MDCK-I- und MDCK-II-Zellen wurden 100.000 Zellen pro *Well* eingesetzt. Für ECIS-Messungen mit Caco-2-Zellen wurden 50.000 Zellen pro *Well* ausgesät. Die Messkammer befand sich während der gesamten Messung in einem Brutschrank mit 37 °C und, abhängig von der verwendeten Zelllinie, in 5 oder 10 % CO<sub>2</sub>. Der Widerstand wurde von einem an das ECIS-System angeschlossenen Computer mit der ECIS Software Version 071113 kontinuierlich aufgezeichnet. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte nach dem Export der Daten in Microsoft Excel.

#### **2.4.3 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands mittels cellZscope**

Für Widerstandsmessungen mit dem cellZscope (nanoAnalytics, Münster, Deutschland) wurden Zellen wie unter 2.4.1 auf Filtern ausgesät und in die Messkammern des cellZscope gestellt. Die Werte für Impedanz,  $R_b$  und  $C_m$  wurden kontinuierlich aufgezeichnet.

#### **2.4.4 Permeationsmessungen**

Mit den Permeationsmessungen sollte die Bedeutung einzelner Aminosäuren in der 2. EZS von Cld5 für dessen abdichtende Funktion gegenüber Molekülen untersucht werden. Da bereits bekannt war, dass Cld5 den parazellulären Spalt gegenüber Molekülen < 800 Da abdichtet [Nitta, 03], wurden mit Fluoresceindinatriumsalz (FDS, 376 Da) und 10 kDa-Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FD10, 10 kDa) Moleküle unterhalb und oberhalb dieser Größenordnung für die Permeationsmessungen ausgewählt. Außerdem wurden die Permeationsmessungen genutzt, um die Wirkung von *tight junction*-mimetischen Peptiden auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen zu untersuchen.

Die Permeationsmessungen wurden auf PCF-Filtern durchgeführt. In Vorversuchen wurden die FDS- und FD10-Permeationskoeffizienten ( $P_{coeff}$ ) zellfreier PCF-Filter bestimmt, um bei späteren Permeationsmessungen mit zellbewachsenen Filtern den Einfluss der Filter auf den jeweiligen  $P_{coeff}$  abzugrenzen. Dabei blieben der  $P_{coeff}$  (FDS) und  $P_{coeff}$  (FD10) bei verschiedenen Substratkonzentrationen (4 - 40 µg/ml) und Inkubationszeiten (10 - 60 min) konstant. Zellfreie PCF-Filter wiesen einen  $P_{coeff}$  (FDS) von  $5,1 \cdot 10^{-5}$  cm/s und einen  $P_{coeff}$  (FD10) von  $7,6 \cdot 10^{-5}$  cm/s auf. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Versuche frei von Sättigungseffekten waren.

Jeder Permeationsmessung gingen TER-Messungen der Filterkulturen voraus, um die Dichtigkeit des *Monolayers* nachzuweisen. Vor der Permeationsmessung wurde das jeweilige Standardmedium (2.3.1) aus den *Wells* und den Filtern abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS +/- gewaschen. Danach wurden entsprechend der Filtergröße 400 bzw. 1600 µl 100 µM FDS oder 2,5 µM FD10 in HBSS (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) auf die apikale Seite der Zellen pipettiert. Der basale Bereich wurde mit 600 µl bzw. 2 ml HBSS gefüllt. Nach 10 min wurden jeweils drei 100 µl Aliquots aus dem basalen Kompartiment entnommen. Die Fluoreszenzintensität der Aliquots wurde mit einem Plattenreader (Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Dabei erfolgte die Anregung des FDS durch Licht mit einer Wellenlänge von 460 nm und die Detektion der Fluoreszenz bei 515 nm. FD10 wurde bei 485 nm angeregt und die Fluoreszenzintensität bei 520 nm detektiert. Aus den Fluoreszenzintensitäten wurde mittels folgender Formel der  $P_{coeff}$  berechnet [Gaillard, 01]:

$$P_{coeff} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0 \cdot 60} \quad (\text{cm/s})$$

dQ: FNS- oder FD10-Menge im basolateralen Medium nach einer bestimmten Zeitspanne dt

A: Fläche des Filters

C<sub>0</sub>: Ausgangskonzentration von FNS oder FD10 auf der apikalen Seite des Filters

60: Umrechnungsfaktor von min in sec

Im Anschluss an die Permeationsmessungen wurde erneut der TER bestimmt, um sicherzustellen, dass der *Monolayer* durch die Waschschriffe und den Mediumwechsel nicht beschädigt wurde.

## 2.4.5 Applikation von Claudinpeptiden

Um die Wirkung verschiedener muriner Claudinpeptide auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen zu untersuchen, wurden Caco-2- und MDCK-II-Zellen wie unter 2.3.10 beschrieben auf PCF-Filtern ausgesät und nach Erreichen des maximalen TER mit Claudinpeptiden behandelt (Tabelle 18). Bei der Herstellung dieser Peptide wurden aus synthesesetechnischen Gründen alle vorhandene Cysteine standardmäßig durch Serine ersetzt und die C-Termini amidiert.

**Tabelle 18: Liste der Claudinpeptide**

Peptid	Strukturbereich	Aminosäuresequenz (N-terminal → C-terminal)
Cld1 <sub>53-81</sub>	C-terminaler Abschnitt der 1. EZS von Cld1	SSVSQSTGQIQSKVFDSLLNLNSTLAQATR-NH <sub>2</sub>
Cld1 <sub>1-31</sub>	1. TMD von Cld1	MANAGLQLLGFI LAFLGWIGAIVSTALPQWRKKKK-NH <sub>2</sub>
Cld2 <sub>53-81</sub>	C-terminaler Abschnitt der 1. EZS von Cld2	ECATHSTGITQCDIYSTLLGLPADIQAAQ-NH <sub>2</sub>
Cld3 <sub>140-159</sub>	2. EZS von Cld3	NTIIRDFYNPLVPEAQKREM-NH <sub>2</sub>
Cld5 <sub>53-81</sub>	C-terminaler Abschnitt der 1. EZS von Cld5	SSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAEVQAAR-NH <sub>2</sub>
GlyR-TDM	2. TMD des Glycinrezeptors	KKKKPARVGLGITTVLVTTIGLGVRAP-NH <sub>2</sub>

Der TER der Zellen wurde vor der Applikation der Peptide sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Nach 48-stündiger Inkubationszeit wurden außerdem der  $P_{coeff}$  (FDS) und der  $P_{coeff}$  (FD10) in Permeationsmessungen bestimmt (2.4.4).

## 2.4.6 Herstellung kalziumfreier Medien

Der Aufbau und die Aufrechterhaltung von TJ sind  $Ca^{2+}$ -abhängige Prozesse. Bei  $Ca^{2+}$ -Mangel kommt es innerhalb von 15 min zur Internalisierung von TJ-Proteinen und damit zum Zusammenbruch der TJ. Nach Wiederaufnahme von  $Ca^{2+}$  werden die TJ wieder aufgebaut. Diese Vorgänge sollten bei Cld5-Mutanten, die stabil in MDCK-II-Zellen transfiziert wurden, und bei Caco-2-Zellen, die mit CPE behandelt wurden, untersucht werden. Um

Ergebnisse zu erhalten, die von der Methode des  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzugs unabhängig waren, wurden zwei verschiedene Protokolle zur Herstellung  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Medien angewandt.

Bei der ersten Methode wurde  $\text{Ca}^{2+}$  durch Zugabe von 2 mM EGTA (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) zu DMEM (ohne Zusätze) gebunden, wodurch im Medium kein frei verfügbares  $\text{Ca}^{2+}$  mehr vorhanden war. Bei der zweiten Methode wurde  $\text{Ca}^{2+}$  zunächst mittels Chelex 100 aus FCS entfernt, welches anschließend zur Herstellung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mangelmedium mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem S-MEM genutzt wurde (Tabelle 8). Chelex 100 ist ein chelatbildendes Harz mit einer hohen Affinität für polyvalente Metallionen. Zur Herstellung einer Gebrauchslösung wurden 10 g Chelex 100 mit einer Maschenweite von 50 - 100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in 50 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  aufgenommen. Überschüssiges  $\text{dH}_2\text{O}$  wurde mittels Whatman-Filterpapier vom gequollenen Chelex 100 getrennt. Das Gewicht des Harzes wurde erneut bestimmt und danach mit der fünffachen Menge FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland) gemischt. Der pH-Wert der Suspension wurde mit verdünnter Salzsäure (J.T. Baker, Deventer, Holland) auf 7,4 eingestellt. Die Suspension wurde über Nacht unter ständigem Schütteln bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension 5 min bei 300 x g zentrifugiert, um das nun  $\text{Ca}^{2+}$ -freie FCS vom Chelex zu trennen. Der Überstand der Suspension wurde mit einem 0,45 µm Filter steril filtriert.

#### **2.4.7 Kalziumdepletion und *calcium switch assay***

$\text{Ca}^{2+}$ -Depletionen wurden durchgeführt, um die Rolle des Y148 von Cld5 bei der durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Mangel ausgelösten Internalisierung von Cld5 und Cld1 zu untersuchen. Dafür wurden MDCK-II-Zellen, die Cld5<sub>wt</sub> oder Cld5<sub>Y148A</sub> stabil exprimierten, nach dreitägiger Kultivierung in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem MDCK-II-Standardmedium (2.3.1) auf  $\text{Ca}^{2+}$ -freies Medium (entweder DMEM mit 2 mM EGTA oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Mangelmedium, 2.4.6) umgestellt. Die Zellen wurden nach 0, 30, 60, 120 und 180 min Kultivierung in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium fixiert (2.3.7). Die subzelluläre Lokalisation von Cld1 und Cld5 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert.

Der *calcium switch assay* wurde durchgeführt, um die Rolle des Y148 von Cld5 beim Wiederaufbau der TJ nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion und anschließender  $\text{Ca}^{2+}$ -Resupplementierung zu analysieren. Dafür wurden die MDCK-II-Zellen nach 16 h Inkubation in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium für weitere 0, 30, 60, 120 und 180 min in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem

MDCK-II-Standardmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, fixiert und die subzelluläre Lokalisation von Cld1 und Cld5 mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Außerdem wurde der *calcium switch assay* verwendet, um den Einfluss verschiedener CPE-Konstrukte auf den Wiederaufbau der TJ zu untersuchen. Dafür wurden Caco-2-Zellen zunächst in Caco-2-Standardmedium kultiviert und nach dem Erreichen der Konfluenz einem *calcium switch assay* unterzogen. Die Zellen wurden parallel zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Resupplementierung mit CPE behandelt. Anschließend wurde der TER über einen Zeitraum von 11 h gemessen.

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten für *Western Blots*

Gesamtzellextrakte, die mittels *Western Blot* analysiert werden sollten, wurden aus Zelllinien hergestellt, die in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert wurden. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem Schaber zweimal in je 5 ml PBS geerntet. Die Zelllysate wurden in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 1200 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

### 2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Gesamtzelllysaten

Die Proteinkonzentration von Gesamtzelllysaten wurde mit dem BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Thermo Scientific/ Pierce, Bonn, Deutschland) nach Herstellerangaben bestimmt. Dafür wurden die Zellpellets (2.5.1) in 200 µl Ripa-Puffer (mit Proteaseinhibitoren) aufgenommen, resuspendiert und durch fünfmaliges Aufziehen in einer 24 G Kanüle homogenisiert. 10 µl dieses Homogenats wurden mit 90 µl dH<sub>2</sub>O verdünnt und mit 2 ml Arbeitslösung (Lösung A und B in einem Verhältnis 50:1) vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 562 nm und RT im Spektrophotometer DU 640 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) bestimmt. Um die Proteinkonzentration der Proben zu berechnen, wurde parallel eine BSA-

Standardreihe mitgeführt, die Proben mit 2,5, 12,5, 25, 50, 75, 100, 150 und 200 µg BSA/100 µl umfasste.

### **2.5.3 Diskontinuierliche *sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Bei dieser Form der Elektrophorese werden vollständig denaturierte und mit 1,4 g SDS/g Protein beladene Proteine in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt. Diese Methode wurde genutzt, um die Expression endogener TJ-Proteine in NRC und MDCK-II-Zellen zu analysieren. Außerdem wurde die Expression der FLAG-Cld5-Proteine und des endogenen Cld1 in stabil transfizierten MDCK-II-Zellen mittels Western Blot analysiert. Die Expression von  $\beta$ -Aktin und GAPDH wurde untersucht, um die eingesetzten Proteinmengen zu normalisieren.

Die verwendeten SDS-Polyacrylamidgele und Gelelektrophoresepuffer wurden nach dem Standardprotokoll von Sambrook 1989 hergestellt. Zur Vorbereitung einer Probe von Gesamtzellextrakten wurden 40 µg Protein mit 4 x SDS-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 60 °C inkubiert. Das Trenngel wurde schnell zwischen zwei vertikale Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem sich eine gerade Phasengrenze ausgebildet hatte, wurde das Isopropanol mit Whatman-Filterpapier vollständig entfernt und mit Sammelgel überschichtet, in das ein Kamm eingesetzt wurde. Nach der Polymerisierung des Sammelgels wurde das gesamte Polyacrylamidgel vertikal in SDS Laufpuffer getaucht, der Kamm entfernt und die Taschen gespült. Die Proteine wurden in der Gelelektrophoresekammer Hoefer SE 250 (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) bei konstanter Spannung aufgetrennt. Die Spannung betrug im Sammelgel 80 Volt und im Trenngel 120 Volt. Um das Molekulargewicht der Proteinbanden abzuschätzen, wurde ein Proteingrößenmarker (SeeBlue® Plus 2 Prestained Marker, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mitgeführt.

### **2.5.4 Western Blot**

Um die aufgetrennten Proteine immunologisch zu detektieren, wurden sie zunächst vom Gel auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Transfermembran (Hybond™-ECL oder Hybond™-P, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) übertragen.

Dafür wurde das SDS-Polyacrylamidgel und die Transfermembran 5 min in Transferpuffer (Tabelle 19) äquiliбриert. Bei der Verwendung einer PVDF-Membran verwendet, wurde diese vor dem Äquilibrieren 2 min in Methanol aktiviert.

Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte in einer *Semi-Dry*-Transferzelle (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Zunächst wurde in Transferpuffer getränktes Filterpapier (3 mm; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) auf die Anode gelegt. Darauf wurden die Transfermembran, das SDS-Polyacrylamidgel und weiteres, in Transferpuffer getränktes Filterpapier darauf geschichtet. Vor dem Auflegen der Kathode wurden Luftblasen aus dem System entfernt. Der Proteintransfer erfolgte 45 min bei RT und einer konstanten Spannung von 20 V.

Nach dem Transfer wurde die Membran 1 min bei RT in Ponceau-S-Lösung inkubiert, um die Proteine zu fixieren. Da Ponceau-S Lösung sämtliche übertragene Protein anfärbt, wurde sie zunächst unvollständig mit H<sub>2</sub>O abgespült, um die Integrität der Proteine, die Beladung des Gels, die *Blotting*-Effizienz und den Gellauf zu kontrollieren. Anschließend wurde die Ponceau-S-Lösung mittels dH<sub>2</sub>O vollständig entfernt. Um die proteinfreien Bindungsstellen auf der Transfermembran unspezifisch zu blockieren, wurde sie über Nacht bei 4 °C in TBSTM inkubiert.

**Tabelle 19: Puffer für *Western Blots***

Puffer	Zusammensetzung
Ponceau-S-Färbelösung	0,2 % Ponceau S in 1 % Essigsäure
TBST	20 mM Tris/HCl pH-Wert 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20
TBSTM	TBST mit 3 % Magermilchpulver
Transferpuffer	25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 20 % Methanol

### 2.5.5 Immunologische Detektion von Proteinbanden auf Membranen

Zur immunologischen Detektion von Proteinen auf der Membran wurde diese zunächst 1,5 h bei RT mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurde sie bei RT dreimal je 10 min mit TBST gewaschen, 45 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert und erneut dreimal je 10 min mit TBST gewaschen. Die verwendeten Konzentrationen der genutzten Antikörper sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Da alle verwendeten Sekundärantikörper



per kovalent an Meerrettichperoxidase gekoppelt waren, wurden die Proteinbanden stets mit dem ECL-Kit (Amersham GE Healthcare, München, Deutschland) nach Herstellerangaben mit Hilfe eines Lumi Imagers (Roche, Mannheim, Deutschland) detektiert.

**Tabelle 20: Liste der Antikörper für die immunologische Detektion von Proteinbanden auf Membranen**

Antikörper	Verdünnung
anti-Kaninchen-HRP-Konjugat	1:2500
anti-Maus-HRP-Konjugat	1:2500
Kaninchen-anti-Clid1	1:2000
Kaninchen-anti-Clid2	1:3000
Kaninchen-anti-Clid3	1:3000
Kaninchen-anti-Clid5	1:3000
Kaninchen-anti-FLAG	1:3000
Maus-anti-Clid4	1:1000
Maus-anti-Clid5	1:3000
Maus-anti-GPDH	1:1000
Maus-anti-ZO-1	1:5000
Maus-anti- $\beta$ -Aktin	1:5000

### 2.5.6 *Strippen von Membranen*

Um Proteine gleicher Größenordnung ohne gegenseitige Beeinflussung auf einer gebloteten Membran zu detektieren, wurden die gebundenen Antikörper durch zweistündige Inkubation in Ablösepuffer (62,5 mM Tris/HCl pH-Wert 6,7; 100 mM 2-Mercaptoethanol; 2 % SDS) bei RT von der Membran gewaschen. Anschließend wurde der *Blot* 2 h bei RT mit 5 % Milchpulver in TBST inkubiert.

## 2.6 Statistik

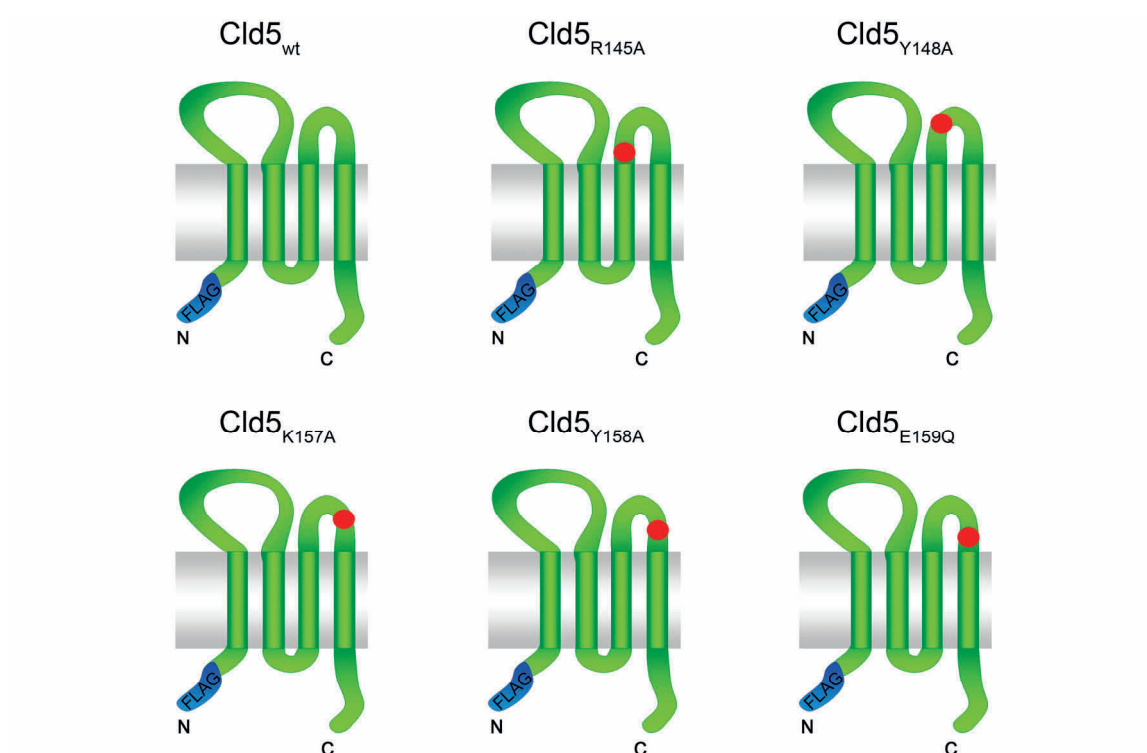
Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe der Software Graph Prism Version 3.0 durchgeführt. Unterschiede zwischen den verschiedenen Claudinproteinen oder Peptidbehandlungen wurden beim Vergleich zweier Gruppen mit dem nicht-parametrischen

Mann-Whitney-U-Test bzw. beim Vergleich mehrerer Gruppen mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test und anschließend *Dunn's post*-Test auf statistische Signifikanz untersucht. Unterschiede mit einem p-Wert unter 0,05 wurden als signifikant bezeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Bedeutung einzelner Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die Integrität der *tight junctions*

Die mit Cld5-YFP-Konstrukten stabil transfizierten HEK-293-Zellen waren für die durchgeführten Lokalisationsstudien und indirekten Interaktionsstudien gut geeignet [Piontek, 08]. Für Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, war jedoch ein Zellsystem mit endogenen TJ und daraus resultierender ausreichend hoher parazellulärer Dichtigkeit erforderlich. Da HEK-293-Zellen keine endogenen TJ ausbilden und überdies der TER von Cld5<sub>wt</sub>-YFP-exprimierenden HEK-293-Zellen im klassischen Filterkultursystem niedriger war als der TER der zellfreien Kontrollfilter, konnten HEK-293-Zellen für Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit nicht genutzt werden. Im ECIS-System war der  $R_b$  von Cld5-YFP-exprimierenden HEK-293-Zellen zwar messbar (1000 - 2000  $\Omega$ ), allerdings waren die Werte so gering, dass Schwankungen zwischen verschiedenen Zellklonen eines Cld5-YFP-Konstrukts größer ausfielen (bis zu 1000  $\Omega$ ) als zwischen den mit verschiedenen Cld5-YFP-Konstrukten transfizierten Zellen (bis zu 500  $\Omega$ ). Außerdem waren die von [Piontek, 08] verwendeten Cld5-YFP-Konstrukte für Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit eventuell ungeeignet, weil sich das YFP am C-Terminus der Cld5-Proteine befand, wodurch die ZO-1-Bindungsstelle blockiert wurde. Auch waren die Cld5-YFP-Fusionsproteine im Vergleich zum endogenen Cld5 mehr als doppelt so groß. Daher wurden Cld5-Fusionsproteine hergestellt, die am N-Terminus mit einem FLAG-Tag fusioniert waren (Abbildung 9). Diese FLAG-Cld5-Proteine wiesen neben einer freien ZO-1 Bindestelle am C-Terminus auch eine mit dem endogenen Cld5 vergleichbare Größe auf und sollten daher für Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit gut geeignet sein.

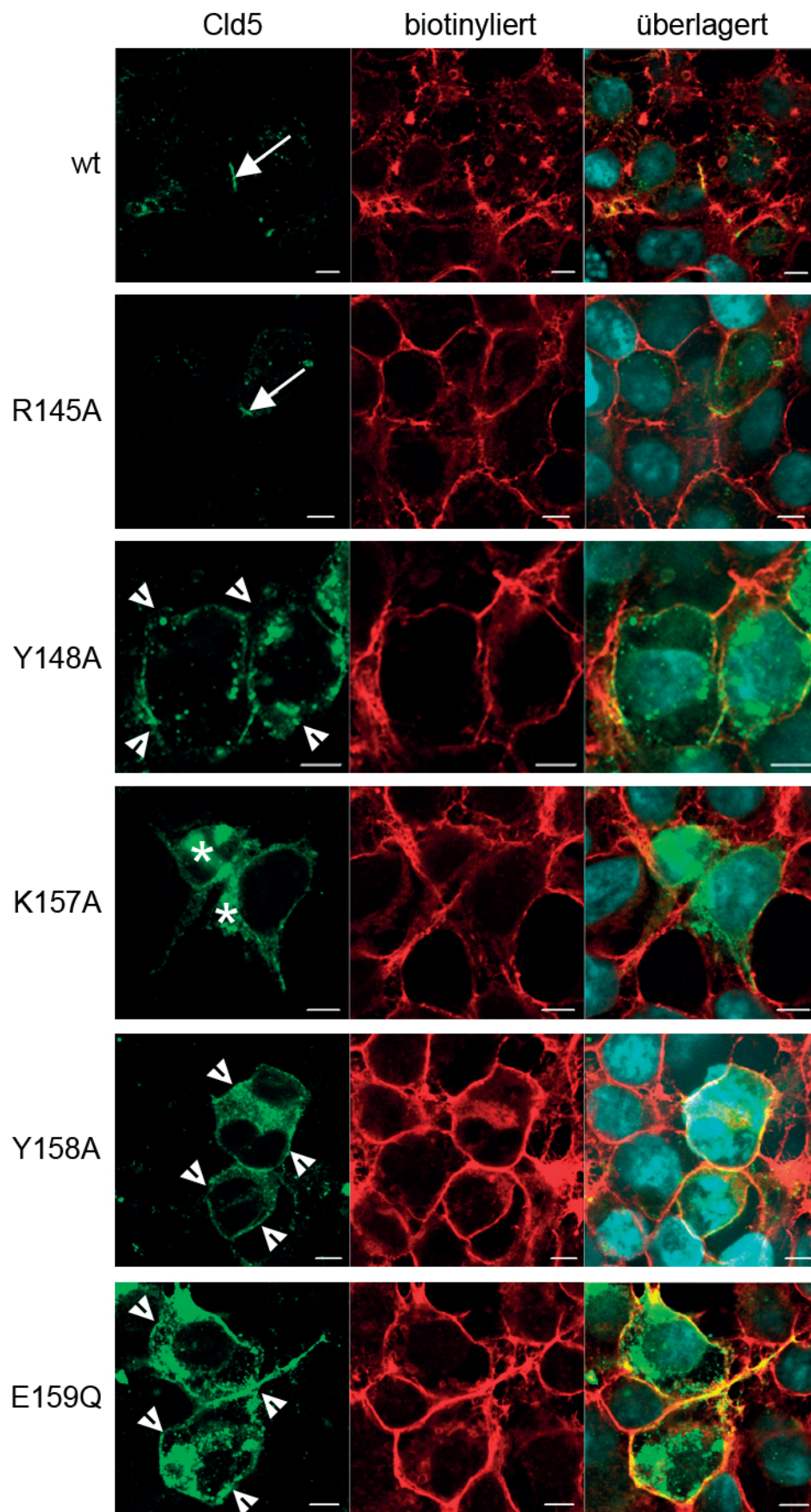


**Abbildung 9: Schematische Darstellung der durch ortsspezifische Mutagenese hergestellten Flag-Cld5-Proteine.** Die Positionen der Aminosäuresubstitutionen sind mit roten Punkten gekennzeichnet.

### 3.1.1 Subzelluläre Lokalisation verschiedener FLAG-Claudin-5-Proteine in HEK-293-Zellen

Um die subzelluläre Lokalisation der hergestellten FLAG-Cld5-Proteine mit der der Cld5-YFP-Proteine von [Piontek, 08] zu vergleichen, wurden die FLAG-Cld5-Konstrukte zunächst ebenfalls in HEK-293-Zellen transfiziert. Damit konnte auch die Lokalisation der neuen FLAG-Cld5-Proteine unabhängig von anderen Claudinen überprüft werden.

Während Flag-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>R145A</sub> nur an Kontaktstellen zweier benachbarter transfizierter Zellen in der Plasmamembran lokalisiert waren, verteilten sich FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> und FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> kontinuierlich über die gesamte Plasmamembran transfizierter Zellen. FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> war unabhängig vom Kontakt der transfizierten Zellen zu anderen transfizierten Zellen intrazellulär lokalisiert (Abbildung 10). Damit entsprach die subzelluläre Lokalisation aller FLAG-Cld5-Konstrukte der Lokalisation ihrer entsprechenden Cld5-YFP oder Cld5-CFP-Konstrukte [Piontek, 08].



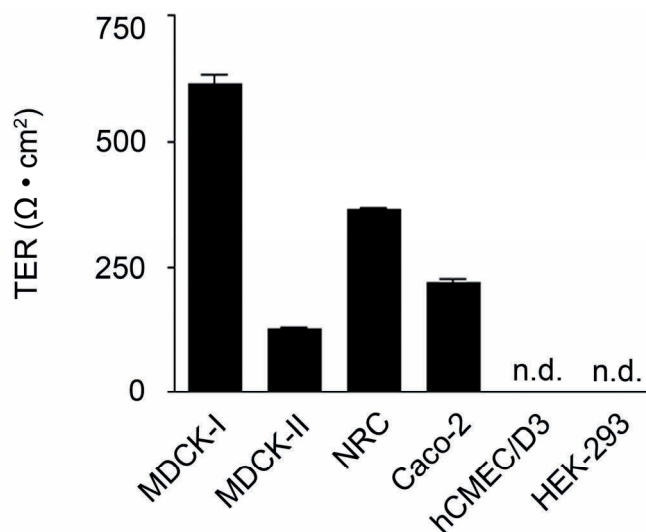
**Abbildung 10: Die subzelluläre Lokalisation der FLAG-Cld5-Proteine stimmt mit der Lokalisation der entsprechenden Cld5-YFP-Proteine von [Piontek, 08] in stabil transfizierten HEK-293-Zellen überein.** Die Zellen wurden stabil mit FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, FLAG-Cld5<sub>R145A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>, FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> oder FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> transfiziert. Cld5 (grün) wurde durch Immunfluoreszenzfärbung mit einem monoklonalen Maus-anti-Cld5-Antikörper detektiert. Die Plasmamembran (rot) wurde mittels Oberflächenbiotinylierung gefärbt (2.3.8). Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. In der Überlagerung erscheinen Cld5-Signale in der Plasmamembran gelb. FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>R145A</sub> wiesen eine Kontaktanreicherung in den benachbarten Plasmamembranen transfizierter Zellen auf (Pfeile). FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>, FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> und FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> waren kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt (Pfeilspitzen). FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> war intrazellulär lokalisiert (Sternchen). Maßstab: 5 µm.

Allerdings gab es zwischen einigen HEK-293-Zellen, die mit FLAG-Cld5<sub>wt</sub> transfiziert wurden, vereinzelt Kontakte, in denen keine eindeutige Anreicherung von Cld5<sub>wt</sub> in der Plasmamembran der benachbarten Zelle zu erkennen war. Ebenso gab es Kontakte zwischen FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>-exprimierenden HEK-293-Zellen, bei der eine Anreicherung von FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> in den Kontaktplasmamembranen nicht ausgeschlossen werden konnte. Auch bei den anderen FLAG-Cld5-Proteinen gab es einzelne Zellen, in denen das transfizierte Konstrukt atypisch lokalisiert war. Die in Abbildung 10 gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen zeigen jedoch die repräsentativen subzellulären Lokalisationen der einzelnen FLAG-Cld5-Konstrukte.

### 3.1.2 Auswahl einer geeigneten Zelllinie für Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit

In den folgenden Experimenten sollte eine Zelllinie identifiziert werden, die endogene TJ ausbildet, kein Cld5 exprimiert und einen ausreichend hohen TER aufweist, um die Wirkung exogener Cld5-Proteine auf die Integrität der TJ in einer heterogenen Claudinumgebung zu untersuchen.

HEK-293-Zellen waren ungeeignet, da selbst HEK-293-Klone, die Cld5<sub>wt</sub>-YFP stabil exprimieren, keinen messbaren TER ausbilden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde zunächst der TER folgender epithelialer und endothelialer Zelllinien mit dem TER von HEK-293 verglichen: MDCK-I, MDCK-II, Caco-2, NRC und hCMEC/D3 (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Zelllinien weisen unterschiedliche TER-Werte auf.** Der TER wurde vier Tage nach Aussaat von 150.000 Zellen pro/cm<sup>2</sup> gemessen. Zuvor wurden die Filter für NRC und hCMEC/D3 mit Rattenschwanzkollagen und für HEK-293-Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Während NRC, MDCK-I-, MDCK-II- und Caco-2-Zellen hohe TER-Werte generierten, wiesen hCMEC/D3 und HEK-293-Zellen TER-Werte  $\leq 10 \Omega \cdot \text{cm}^2$  auf, die sich nicht signifikant vom TER zellfreier Filter unterschieden (Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*, n.d.: nicht detektierbar).

Sowohl hCMEC/D3 als auch HEK-293-Zellen bildeten nur sehr geringe Widerstände aus, so dass sich ihr TER nicht signifikant vom TER zellfreier Filter unterschied (Abbildung 11). Daher waren sie für parazelluläre Dichtigkeitsmessungen ungeeignet.

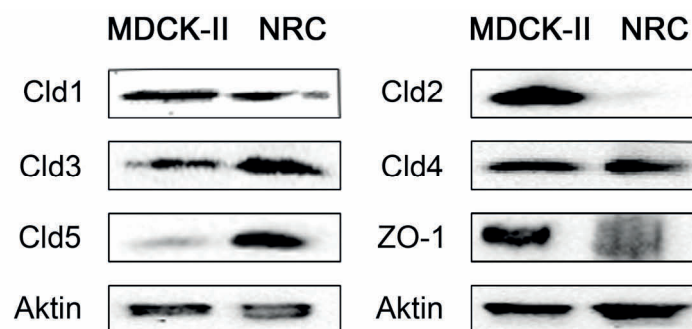
Die MDCK-I-Zellen wiesen von allen untersuchten Zelllinien den höchsten TER auf (Abbildung 11). Allerdings betrug die Transfektionseffizienz dieser Zellen sowohl bei Lipofektion als auch bei Elektroporation nur etwa 2 %. Da in den anschließenden parazellulären Dichtigkeitsmessungen die Bedeutung einzelner Aminosäuren der 2. EZS von Cld5 für die *TJ*-Integrität untersucht werden sollte, indem exogene FLAG-Cld5-Proteine stabil in Epithelzellen transfiziert werden sollten, war eine möglichst hohe Transfektionseffizienz der Zellen erforderlich. Daher waren MDCK-I-Zellen für die parazellulären Dichtigkeitsmessungen ungeeignet.

Die Caco-2-Zellen, die einen ausreichend hohen TER generierten (Abbildung 11), waren ebenfalls aufgrund ihrer geringen Transfektionseffizienz von unter 2 % für die späteren parazellulären Dichtigkeitsmessungen ungeeignet.

Sowohl NRC als auch MDCK-II-Zellen bildeten ausreichend hohe TER-Werte aus, um als geeignete Kandidaten für parazelluläre Dichtigkeitsmessungen angesehen zu werden

(Abbildung 11). Die Transfektionseffizienz der MDCK-II-Zellen bzw. NRC betrug sowohl bei Lipofektion als auch bei Elektroporation etwa 10 bzw. 5 %.

In einem weiteren Schritt sollte die Expression endogener TJ-Proteine in MDCK-II-Zellen und NRC mittels *Western Blot* untersucht werden. Sowohl MDCK-II-Zellen als auch NRC exprimierten alle untersuchten TJ-Proteine (Abbildung 12). Während die Expression von endogenem Cld1 und Cld4 in beiden Zelllinien vergleichbar war, wurden bei Cld2, Cld3, Cld5 und ZO-1 Unterschiede detektiert. Obwohl ein Vergleich der Expressionstärken zwischen beiden Zelllinien nur unter der Annahme zulässig ist, dass sich die verwendeten Antikörper in ihrer Spezifität für Hund und Ratte nicht unterscheiden, wurde festgestellt, dass die Signale für Cld2 und ZO-1 in MDCK-II-Zellen im Vergleich zu NRC intensiver waren. Im Gegensatz dazu wurden Cld3 und Cld5 in NRC stärker exprimiert. (Abbildung 12). Die schwache Cld5-Bande in MDCK-II-Zellen ist vermutlich auf eine Kreuzreaktivität des verwendeten monoklonalen Maus-anti-Cld5-Antikörpers mit Cld3 zurückzuführen, da in früheren Versuchen gezeigt wurde, dass dieser Antikörper exogenes Cld3 in claudinfreien HEK-293-Zellen detektiert (persönliche Kommunikation mit Dr. Jörg Piontek, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Deutschland).



**Abbildung 12: Detektion endogener TJ-Proteine in MDCK-II-Zellen und NRC mittels *Western Blot*.** Die Proteine wurden wie unter 2.5.5 beschrieben detektiert. Sowohl MDCK-II-Zellen als auch NRC exprimierten alle untersuchten TJ-Proteine. B-Aktin diente als Ladungskontrolle.

Da NRC im Vergleich zu MDCK-II-Zellen einen höheren endogenen Cld5-Hintergrund und eine niedrigere Transfektionseffizienz aufwiesen, wurden die MDCK-II-Zellen zur stabilen Transfektion der FLAG-Cld5-Konstrukte ausgewählt, um die Bedeutung einzelner Aminosäuren der 2. EZS von Cld5 für die parazelluläre Dichtigkeit zu untersuchen.

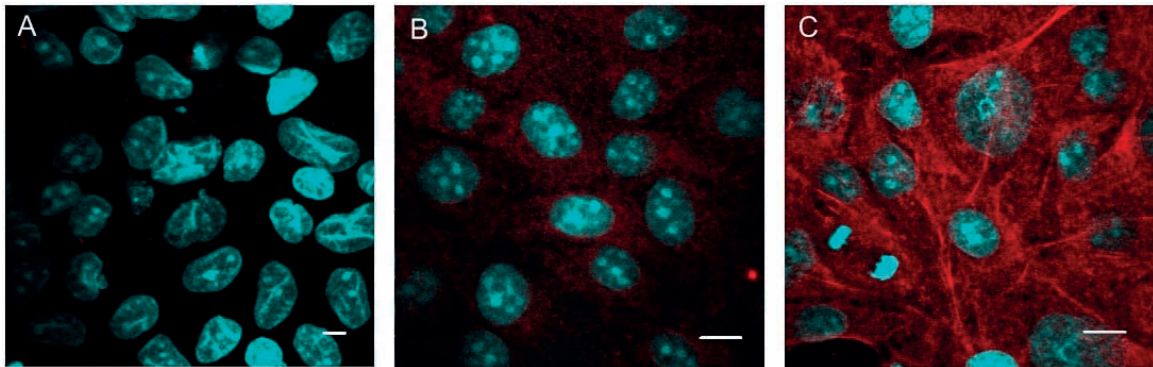


### **3.1.3 Subzelluläre Lokalisation verschiedener FLAG-Claudin-5-Proteine in MDCK-II-Zellen**

#### **3.1.3.1 Spezifität des anti-FLAG-Primärantikörpers**

Die subzelluläre Lokalisation der FLAG-Cld5-Proteine wurde zunächst in transient transfizierten MDCK-II-Zellen untersucht. Drei Tage nach der Transfektion wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörper durchgeführt. Erfahrungsgemäß können verschiedene Chargen eines Antikörpers unterschiedliche Spezifitäten für das Epitop aufweisen. Auch bei diesem anti-FLAG-Antikörper wurden chargenbedingte Unterschiede beobachtet. Da im Verlauf dieser Arbeit transiente (und stabile) Transfektionen von MDCK-II-Zellen zunächst mit FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> und anschließend mit den übrigen FLAG-Cld5-Mutanten durchgeführt wurden, mussten für die Immunfluoreszenzfärbungen verschiedene Chargen des polyklonalen Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers verwendet werden.

Für die Immunfluoreszenzfärbung der mit FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> transfizierten MDCK-II-Zellen wurde ein anti-FLAG-Antikörper der Charge A verwendet, der das FLAG-Tag hochspezifisch erkannte, so dass keine Hintergrundsignale entstanden (Abbildungen 13A, 14, 15). Bei den Immunfluoreszenzfärbungen der anschließend mit den übrigen FLAG-Cld5-Mutanten transfizierten MDCK-II-Zellen wurde bereits die Charge B des gleichen anti-FLAG-Antikörpers verwendet (Abbildungen 13B, 16, 17). Diese später verwendete Charge wies eine niedrigere Spezifität auf, so dass Hintergrundsignale beobachtet wurden. In Abbildung 13 sind die Hintergrundsignale der Chargen A und B sowie einer weiteren Charge C des anti-FLAG-Antikörpers gegenübergestellt.

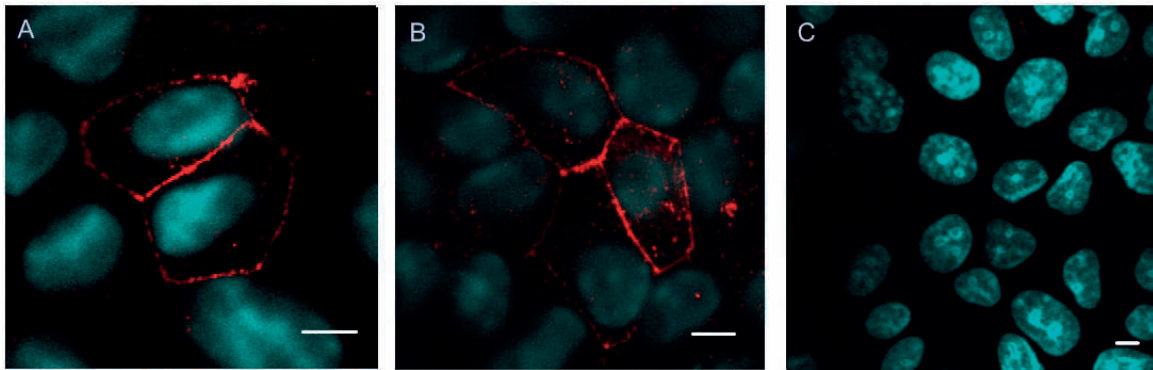


**Abbildung 13: Verschiedene Chargen des Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers unterschieden sich in ihrer Spezifität.** Untransfizierte MDCK-II-Zellen wurden für Immunfluoreszenzfärbungen mit verschiedenen Chargen des polyklonalen anti-FLAG-Primärantikörpers eingesetzt: Charge A, die zur Färbung von FLAG-Cld5<sub>wt</sub>- oder FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen verwendet wurde (**A**), Charge B, die zur Färbung von MDCK-II-Zellen verwendet wurde, die die übrigen FLAG-Cld5-Mutanten exprimierten (**B**) und Charge C, die für Färbungen von FLAG-Cld5-Proteinen ungeeignet war, da starke Hintergrundsignale auftraten, die eine Abgrenzung des exogenen FLAG-Signals vom Hintergrund nicht mehr gestatteten (**C**). Für alle drei Chargen wurde eine Verdünnung von 1:300 eingesetzt. Maßstab: 5  $\mu$ m.

Die Charge C des polyklonalen Kaninchen-anti-FLAG-Antikörpers zeigte so starke Hintergrundsignale, dass sie für spätere Co-Lokalisationsstudien der verschiedenen Cld5-Konstrukte mit anderen TJ-Proteinen nicht genutzt werden konnte. Daher wurde in diesen Experimenten ein monoklonaler Maus-anti-Cld5-Antikörper eingesetzt, der bei Färbungen von untransfizierten MDCK-II-Zellen oder MDCK-II-Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden, geringere Hintergrundsignale aufwies (3.1.5).

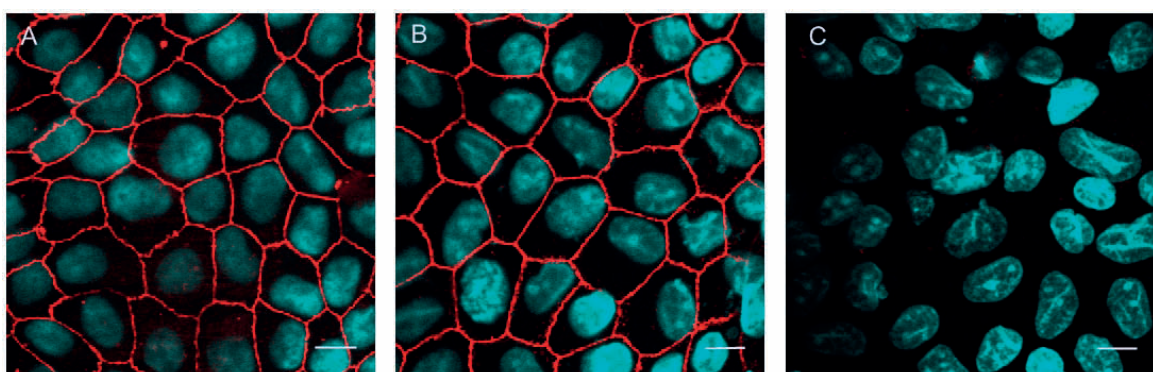
### 3.1.3.2 Expression von Claudin-5<sub>wt</sub> und Claudin-5<sub>Y148A</sub> in MDCK-II-Zellen

Die Immunfluoreszenzfärbungen von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> in transient transfizierten MDCK-II-Zellen ergaben, dass die jeweiligen Cld5-Proteine auch in benachbarten transfizierten Zellen kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt waren (Abbildung 14). Diese Beobachtung stand mit der Kontaktanreicherung von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> in der Plasmamembran benachbarter transient transfizierter HEK-293-Zellen im Widerspruch (Abbildung 10). In transient transfizierten MDCK-II-Zellen erschienen die Signale von Cld5<sub>wt</sub> und Cld5<sub>Y148A</sub> in den benachbarten Plasmamembranbereichen transfizierter Zellen nur bei erster Ansicht stärker. Dieser Eindruck war jedoch darauf zurückzuführen, dass in diesen Bereichen die FLAG-Signale aus beiden Plasmamembranen detektiert wurden.



**Abbildung 14: FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> sind in transient transfizierten MDCK-II-Zellen kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt.** Immunfluoreszenzfärbungen mit der Charge A des polyklonalen Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers (rot) gegen das FLAG-Epitop von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> (A) und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> (B). MDCK-II-Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden (C), dienten als Negativkontrolle. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 5 µm.

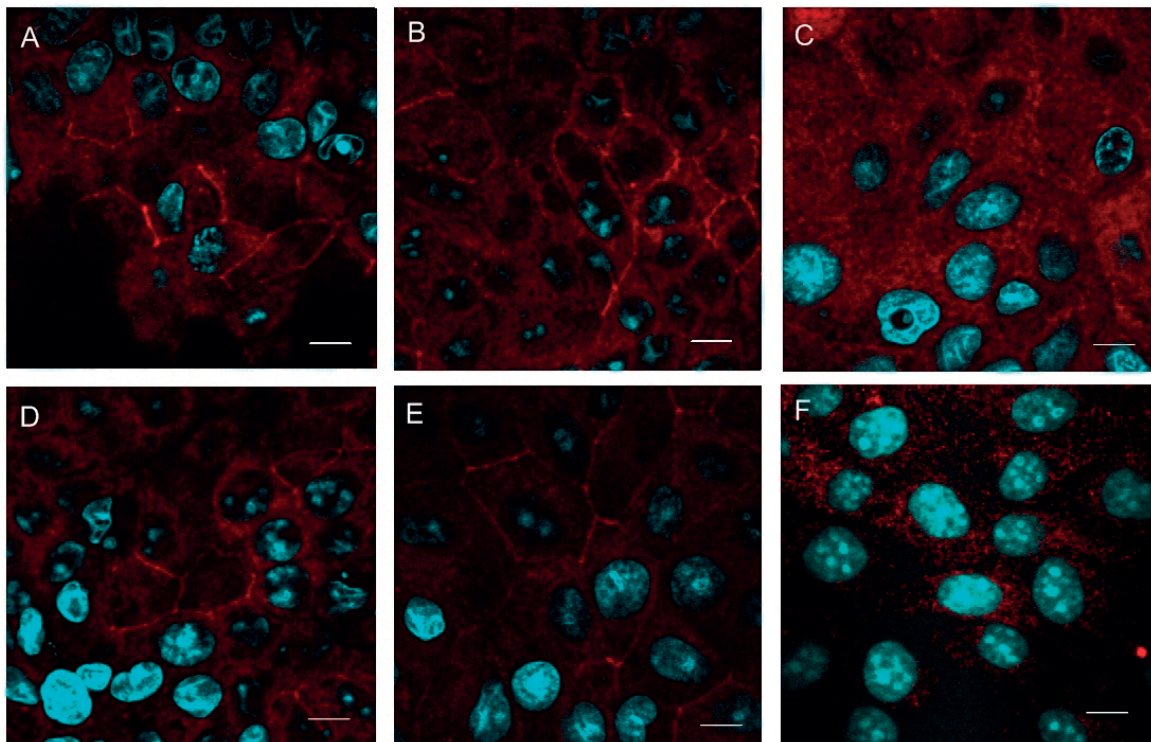
Nachdem eine kontinuierliche Verteilung von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und Cld5<sub>Y148A</sub> über die Plasmamembran transient transfizierter MDCK-II-Zellen nachgewiesen wurde, wurden für die anschließenden parazellulären Dichtigkeitsmessungen (3.1.6) MDCK-II-Zellklone hergestellt, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> oder den Kontrollvektor stabil exprimierten (Abbildung 15). Die subzelluläre Lokalisation von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> oder FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> in diesen Klonen wurde mit Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Sie stimmte mit der subzellulären Lokalisation von transient exprimiertem FLAG-Cld5<sub>wt</sub> bzw. FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> überein (Abbildung 14).



**Abbildung 15: FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> sind in stabil transfizierten MDCK-II-Zellen kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt.** Immunfluoreszenzfärbungen mit der Charge A des polyklonalen Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers (rot) gegen das FLAG-Epitop von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> (A) und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> (B). MDCK-II-Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden (C), dienten als Negativkontrolle. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 µm.

### 3.1.3.3 Expression von Claudin-5<sub>R145A</sub>, Claudin-5<sub>K157A</sub>, Claudin-5<sub>Y158A</sub> und Claudin-5<sub>E159Q</sub> in MDCK-II-Zellen

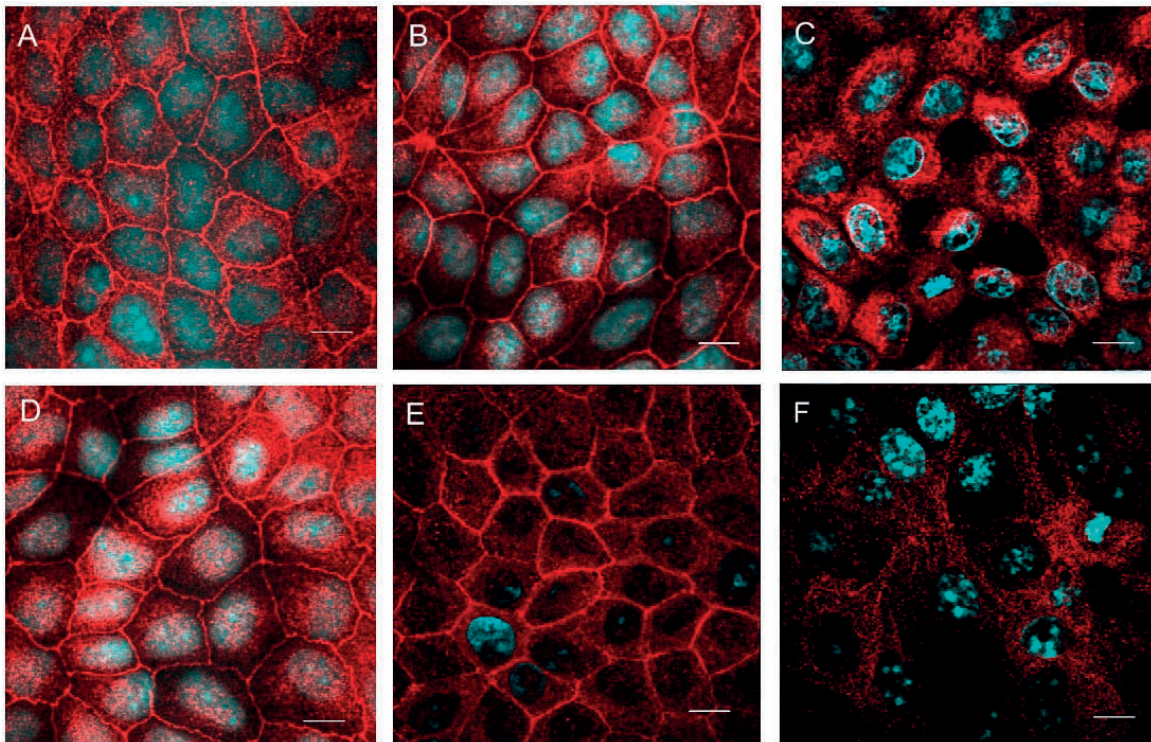
Die subzelluläre Lokalisation der übrigen FLAG-Cld5-Mutanten R145A, K157A, Y158A und E159Q wurde wiederum zunächst in transient transfizierten MDCK-II-Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht (Abbildung 16). Diese Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit der Charge B des polyklonalen Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers durchgeführt und weisen daher im Vergleich zur Charge A, mit der FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> gefärbt wurden (Abbildungen 14 und 15), stärkere Hintergrundsignale auf. Um einen Vergleich mit der spezifischeren Charge A des anti-FLAG-Antikörpers zu erhalten, wurden die MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub> transient exprimierten, mitgefärbt (Vergleich zwischen Abbildung 16A und Abbildung 14A). Da sich in den FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen die Hintergrundsignale mit den intrazellulären FLAG-Signalen überlagerten, gestaltete sich die Auswertung für diese Mutante besonders schwierig. Dennoch wurde in MDCK-II-Zellen, die mit FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> transfiziert wurden, im Vergleich zu untransfizierten Zellen ein stärkeres intrazelluläres Signal detektiert. Folglich war die Mutante Cld5<sub>K157A</sub> sowohl in transient transfizierten HEK-293-Zellen als auch in MDCK-II-Zellen intrazellulär lokalisiert (Abbildung 10, 16C). FLAG-Cld5<sub>R145A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> und FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> waren kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt und wiesen keine Kontaktanreicherung in den Plasmamembranen benachbarter transfizierter Zellen auf (Abbildungen 16B, D, E).



**Abbildung 16: FLAG-Cld5<sub>R145A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> und FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> sind in transient transfizierten MDCK-II-Zellen kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt, wohingegen FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> intrazellulär lokalisiert ist.** Immunfluoreszenzfärbung mit der Charge B des polyklonalen Kaninchen anti-FLAG-Primärantikörper (rot) gegen das FLAG-Epitop von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> (A), FLAG-Cld5<sub>R145A</sub> (B), FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> (C), FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> (D), FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> (E). MDCK-II-Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden (F), dienten als Negativkontrolle. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 µm.

Nach der Verifizierung der korrekten subzellulären Lokalisation der übrigen FLAG-Cld5-Mutanten in transient transfizierten MDCK-II-Zellen wurden auch für diese Konstrukte stabil transfizierte Zelllinien hergestellt. In diesen stabilen Linien wurde die subzelluläre Lokalisation der FLAG-Cld5-Proteine wiederum mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. FLAG-Cld5<sub>R145A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> und FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> waren kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt, wohingegen FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> intrazellulär lokalisiert war (Abbildung 17). Damit stimmte die subzelluläre Lokalisation dieser FLAG-Cld5-Proteine zwischen transient und stabil transfizierten MDCK-II-Zellen überein (Abbildung 16, 17). Um einen Vergleich mit der spezifischeren Charge A des polyklonalen Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers zu erhalten, wurden die MDCK-II-Zellklone, die FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> stabil exprimierten, mitgefärbt (Vergleich zwischen Abbildung 15 B und Abbildung 17A).



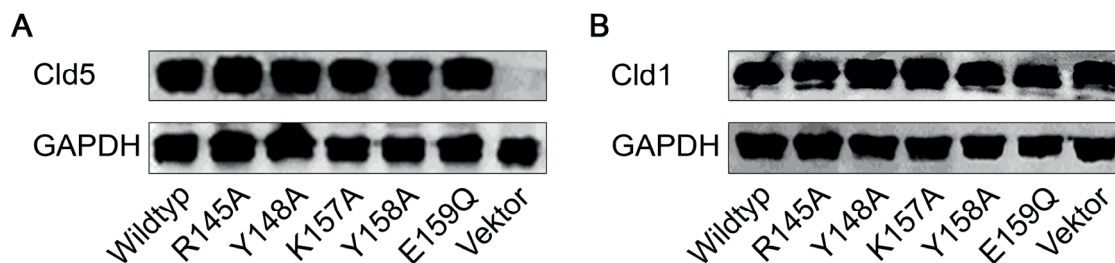


**Abbildung 17: FLAG-Cld5<sub>R145A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> und FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> sind in stabil transfizierten MDCK-II-Zellen kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt, wohingegen FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> intrazellulär lokalisiert ist.** Immunfluoreszenzfärbung mit der Charge B des polyclonalen Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers (rot) gegen das FLAG-Epitop von FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> (A), FLAG-Cld5<sub>R145A</sub> (B), FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> (C), FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> (D), FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> (E). MDCK-II-Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden (F), dienten als Negativkontrolle. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 µm.

Aufgrund der niedrigen Spezifität der Chargen B und C des polyclonalen Kaninchen-anti-FLAG-Primärantikörpers wurde in späteren Lokalisationsstudien ein monoklonaler Maus-anti-Cld5-Primärantikörper genutzt, um exogene FLAG-Cld5-Proteine anzufärben. Mit diesem Antikörper wurde auch bei untransfizierten MDCK-II-Zellen und bei der Vektorkontrolle ein schwaches Signal beobachtet. Allerdings war dieses im Vergleich zu den mit FLAG-Cld5 transfizierten MDCK-II-Zellen vernachlässigbar gering. Vermutlich ist dieses Signal auf eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Cld3 zurückzuführen, da in früheren Versuchen gezeigt wurde, dass dieser Antikörper exogenes Cld3 in claudinfreien HEK-293-Zellen anfärbt (persönliche Kommunikation mit Dr. Jörg Piontek, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Deutschland).

### 3.1.4 Analyse der Expression der FLAG-Claudin-5-Proteine in stabil transfizierten MDCK-II-Zellen mittels *Western Blot*

Für die Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit sollten MDCK-II-Klone eingesetzt werden, die vergleichbare Mengen der FLAG-Cld5-Proteine aufwiesen. Daher wurden die Expressionsstärken der FLAG-Cld5-Proteine in stabil transfizierten MDCK-II-Zellen mittels *Western Blot* verglichen. Alle untersuchten MDCK-II-Klone exprimierten vergleichbare Mengen der Cld5-Proteine (Abbildung 18A). Da bereits gezeigt wurde, dass exogenes Cld5 keinen Einfluss auf die endogene Expression anderer TJ-Proteine hat, wurde an dieser Stelle nur der Nachweis der unveränderten Cld1-Expression erbracht (Abbildung 18B).



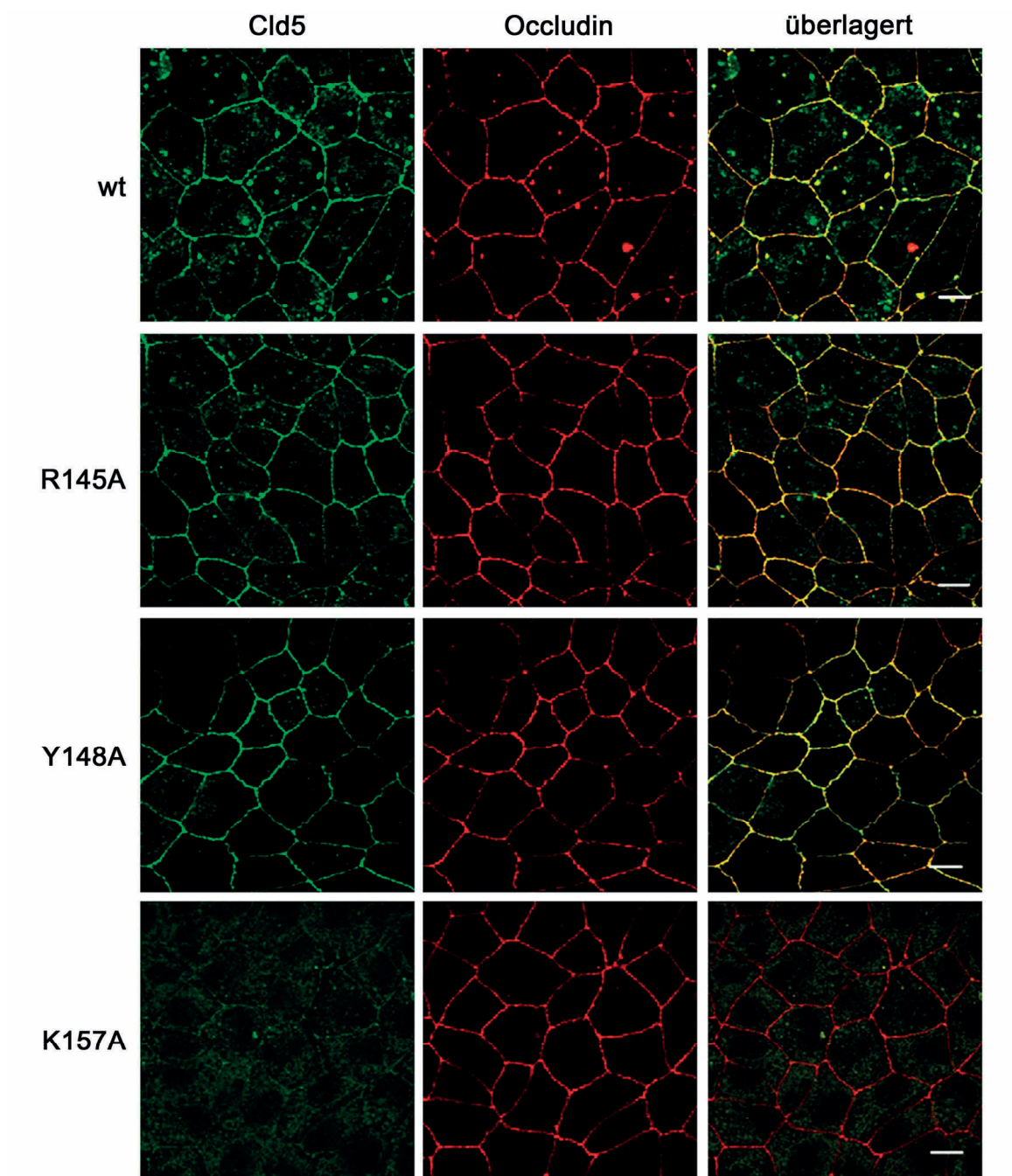
**Abbildung 18: Alle untersuchten stabilen MDCK-II-Zellklone exprimierten vergleichbare Mengen der exogenen FLAG-Cld5-Proteine und des endogenen Cld1.** Analyse von Gesamtzellextrakten mit einem monoklonalen Maus-anti-Cld5-Primärantikörper (A) und einem polyklonalen Kaninchen-anti-Cld1-Primärantikörper (B) im Western Blot. Die Detektion von GAPDH diente zur Normalisierung der eingesetzten Proteinmengen. Mit Ausnahme der Vektorkontrolle exprimierten alle MDCK-II-Klone vergleichbare Mengen der FLAG-Cld5-Proteine (A). Die exogene Expression von Cld5 hatte keinen Einfluss auf die endogene Expression von Cld1 (B).

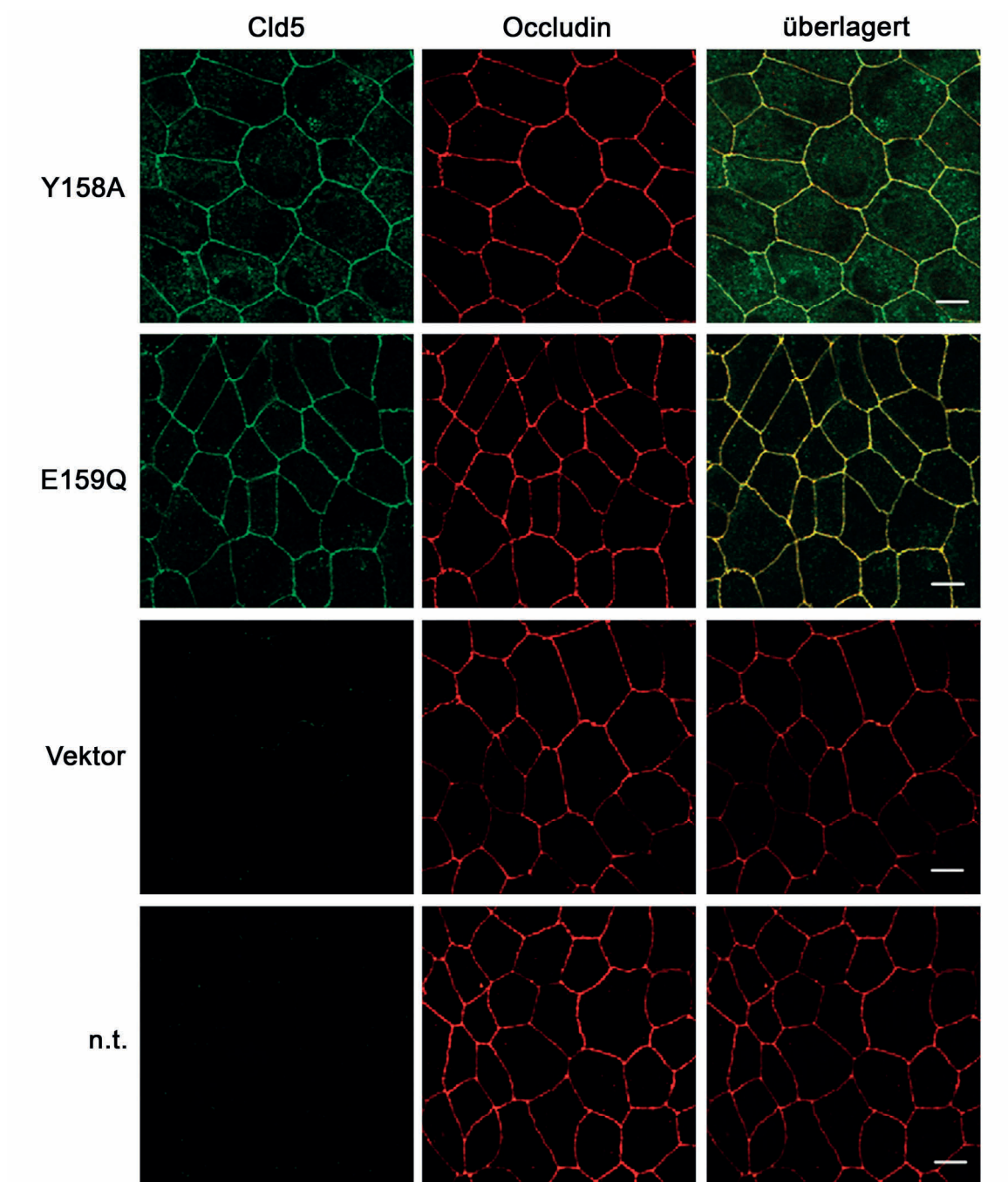
### **3.1.5 Co-Lokalisation von FLAG-Claudin-5-Proteinen mit endogenen *tight junction*-Proteinen**

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die Aminosäuresubstitutionen in der 2. EZS von Cld5 auf dessen Lokalisation in den TJ auswirken. Dafür wurde die Co-Lokalisation der FLAG-Cld5-Proteine mit den endogenen TJ-Proteinen Occludin (Abbildung 19) bzw. Cld1 (Abbildung 20) mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung analysiert.

Für FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und alle Mutanten mit Ausnahme der intrazellulären Mutante FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> wurde eine Lokalisation in der Plasmamembran sowie eine Co-Lokalisation mit Cld1 und Occludin detektiert (Abbildung 19, 20). Folglich waren die Aminosäuren R145, Y148, Y158 und E159 von Cld5 für dessen Co-Lokalisation mit Cld1 oder Occludin nicht relevant. Für die intrazelluläre Mutante FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> wurde keine Co-Lokalisation mit Cld1 oder Occludin in der Plasmamembran beobachtet (Abbildung 19, 20).



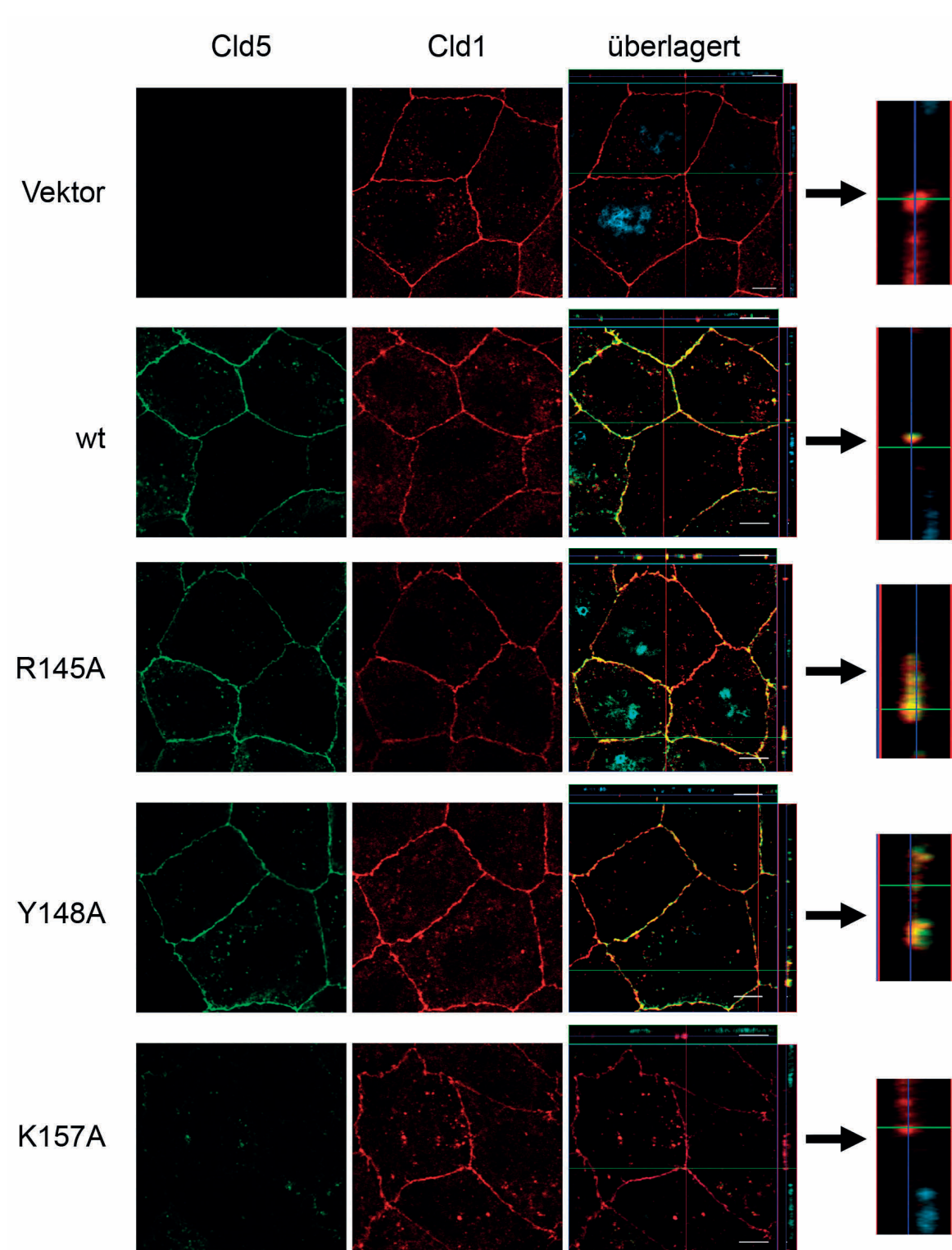




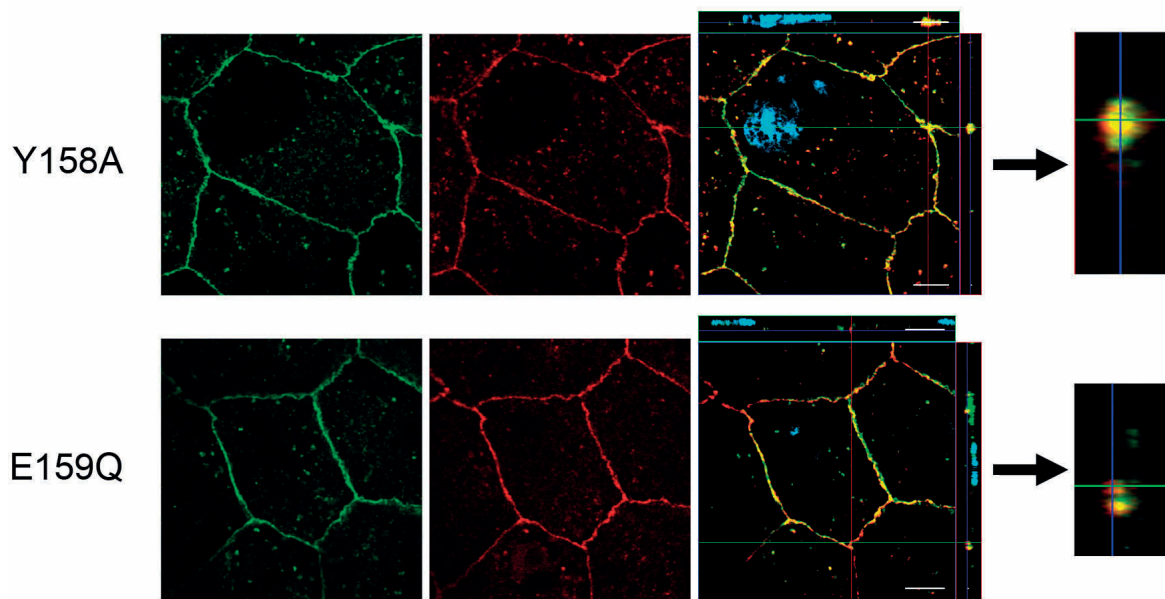
**Abbildung 19: Alle stabil exprimierten FLAG-Cld5-Proteine außer FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> ko-lokalisieren mit endogenem Occludin in MDCK-II-Zellen.** Die Zellen wurden fünf Tage auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden Cld5 (grün) und Occludin (rot) mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung detektiert. Stellen der Co-Lokalisation von Cld5 und Occludin ergaben in der Überlagerung gelbe Signale. Maßstab: 10 µm.

Um die Co-Lokalisation der FLAG-Cld5-Proteine mit endogenem Cld1 nicht nur in der x-y-Ebene, sondern auch in z-Richtung zu analysieren, wurden weiterführende Untersuchungen mit konfokalen Mikroskopen durchgeführt. Ausgehend von einer Ebene unterhalb der basalen Zellkernregion bis zur apikalen TJ-Ebene wurden im Abstand von 0,25 µm Aufnahmen der Zelle angefertigt.

Auch bei diesen Aufnahmen wurde zwischen FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und den FLAG-Cld5-Mutanten mit Ausnahme von FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> kein Unterschied beobachtet. Sowohl FLAG-Cld5<sub>wt</sub> als auch Cld5<sub>R145A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> und FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> wurden in der apikolateralen TJ-Ebene detektiert und wiesen eine Co-Lokalisation mit Cld1 auf (Abbildung 20). Folglich waren die Aminosäuren R145, Y148, Y158 und E159 von Cld5 für dessen Co-Lokalisation mit Cld1 weder in der x-y-Ebene noch in der x-z-Ebene oder in der y-z-Ebene relevant. Erwartungsgemäß wurde bei diesen Aufnahmen in der TJ-Region der FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen nur endogenes Cld1, aber keine Co-Lokalisation von FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> mit Cld1 nachgewiesen, da FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> intrazellulär lokalisiert ist (Abbildung 20).







**Abbildung 20: Alle stabil exprimierten FLAG-Cld5-Proteine außer FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> co-lokalisieren mit endogenem Cld1 in MDCK-II-Zellen.** Die Zellen wurden fünf Tage auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden Cld5 (grün) und Cld1 (rot) mittels Immunfluoreszenzdoppel-färbung detektiert. Stellen der Co-Lokalisation von Cld5 und Cld1 ergaben in der Überlagerung gelbe Signale. Die z-Richtung wurde vergrößert dargestellt (Pfeil). Die unterschiedlichen Größen der überlagerten Signale in z-Richtung resultierten aus den verschiedenen Verläufen der Plasmamembranen zur jeweiligen Schnittebene. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. MDCK-II-Zellen, die mit FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> oder dem Kontrollvektor transfiziert wurden, zeigten keine Co-Lokalisation von Cld5 und Cld1 in der Plasmamembran. Maßstab: 5 µm.

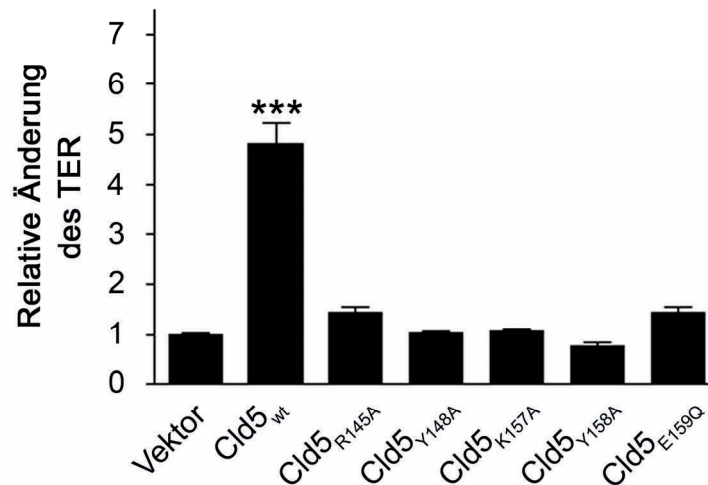
### 3.1.6 Bedeutung einzelner Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die parazelluläre Dichtigkeit von MDCK-II-Zellen

In den folgenden Experimenten sollte die Bedeutung definierter Aminosäuren der 2. EZS von Cld5 für die parazelluläre Dichtigkeit von MDCK-II-Zellen untersucht werden. Dafür wurden sowohl der parazelluläre Widerstand als auch  $P_{coeff}$  (FDS) und  $P_{coeff}$  (FD10) der MDCK-II-Zellklone, die verschiedene FLAG-Cld5-Proteine stabil exprimierten, bestimmt (2.4.1 - 4).

#### 3.1.6.1 Bedeutung für den parazellulären Widerstand

MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub> stabil exprimierten, wiesen sowohl im Vergleich zur Vektorkontrolle ( $p < 0,001$ ) als auch zu allen Zellklonen, die Cld5-Mutanten stabil exprimierten, einen signifikant höheren TER auf. So betrug der TER der FLAG-Cld5<sub>wt</sub> MDCK-II-Klone im Mittel  $507 \pm 42 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und war damit im Vergleich zur Vektorkontrolle, die  $105 \pm 3,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$  aufwies, um den Faktor 4,8 höher. Die TER-Werte der Zellklone, die

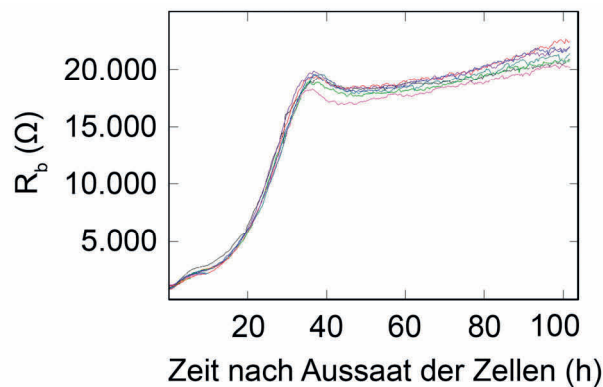
Cld5-Mutanten stabil exprimierten, unterschieden sich weder untereinander noch im Vergleich zur Vektorkontrolle signifikant. Sie lagen zwischen  $80$  und  $152 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Abbildung 21, Tabelle S22 im Anhang).



**Abbildung 21: Die Aminosäuren R145, Y148, K157, Y158 und E159 von Cld5 sind für die von Cld5<sub>wt</sub> vermittelte Erhöhung des TER essentiell.** MDCK-II-Zellklone, die die angegebenen FLAG-Cld5-Proteine stabil exprimierten, wurden auf Filtern ausgesät. Für jedes FLAG-Cld5-Protein wurden mindestens zwei Klone und neun bis zwölf Filter verwendet. Nach drei Tagen wurde der TER gemessen. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM), \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Vektorkontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n > 10$ .

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass alle untersuchten Aminosäuresubstitutionen in der 2. EZS von Cld5 die Erhöhung des TER durch FLAG-Cld5<sub>wt</sub> aufheben. Folglich sind die nativen Aminosäuren an den Positionen 145, 148, 157, 158 und 159 von Cld5 für den Aufbau des TER essentiell.

Neben dem klassischen Filterkultursystem (2.4.1) wurde auch das ECIS-System (2.4.2) genutzt, um den parazellulären Widerstand der stabil transfizierten MDCK-II-Zellen zu messen. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen MDCK-II-Zellen, die mit FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> bzw. dem Kontrollvektor stabil transfiziert wurden, detektiert (Abbildung 22). Damit war das ECIS-System im Gegensatz zum klassischen Filterkultursystem nicht geeignet, um Unterschiede zwischen den parazellulären Widerständen der FLAG-Cld5<sub>wt</sub>- und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen zu detektieren. Folglich wurden die übrigen FLAG-Cld5-Mutanten nicht im ECIS-System analysiert.



**Abbildung 22: MDCK-II-Zelllinien, die mit FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> oder dem Kontrollvektor stabil transfiziert wurden, bilden im ECIS-System keine unterschiedlichen parazellulären Widerstände aus.** Dargestellt sind die  $R_p$ -Werte von je drei verschiedenen FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>- und Kontrollvektor-MDCK-II-Zellklonen.

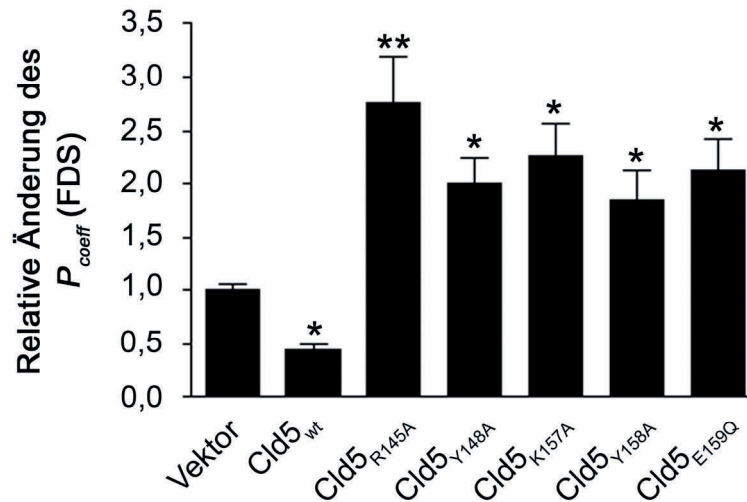
Desweiteren wurde der parazelluläre Widerstand von FLAG-Cld5<sub>wt</sub>- und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen mit dem cellZscope-Gerät gemessen (2.4.3), dass kurzzeitig zur Verfügung stand. Dabei war der parazelluläre Widerstand der FLAG-Cld5<sub>wt</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle und den Cld5<sub>Y148A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen um den Faktor 5 erhöht. Folglich wurden die Messergebnisse aus dem klassischen Filterkultursystem reproduziert. Aufgrund der zeitlich beschränkten Verfügbarkeit des cellZscope-Geräts konnten die übrigen FLAG-Cld5-Mutanten nicht analysiert werden.

### 3.1.6.2 Bedeutung für die parazelluläre Permeation von Fluoresceindinatrium-salz

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob R145, Y148, K157, Y158 und E159 von Cld5 auch für die Abdichtung gegen die parazelluläre Permeation kleiner Moleküle relevant sind. Dafür wurde der  $P_{coeff}$  (FDS) bestimmt (2.4.4). FDS ist ein 376 Da großes Salz, das keine toxische Wirkung auf Zellen hat und daher die Integrität des *Monolayers* nicht beeinträchtigt [O'goshi, 06; Chang, 05].

Die stabile Expression von Cld5<sub>wt</sub> reduzierte die parazelluläre Permeabilität von MDCK-II-Zellen gegenüber FDS im Vergleich zur Vektorkontrolle ( $p < 0,05$ ) sowie im Vergleich zu allen Cld5-Mutanten ( $p < 0,01$ ) signifikant (Abbildung 23, Tabelle S23 im Anhang). Im Gegensatz dazu wiesen alle MDCK-II-Zellklone, die mutierte FLAG-Cld5-Proteine exprimierten, im Vergleich zur Vektorkontrolle eine signifikant höhere parazelluläre Permeabi-

lität gegenüber FDS auf ( $p < 0,01$  für Cld5<sub>R145A</sub> sowie  $p < 0,05$  für Cld5<sub>Y148A</sub>, Cld5<sub>K157A</sub>, Cld5<sub>Y158A</sub> und Cld5<sub>E159Q</sub>). Die Permeationskoeffizienten dieser Mutanten betrugen  $6,26 \cdot 10^{-6}$  bis  $9,34 \cdot 10^{-6}$  cm/s und waren damit im Vergleich zur Vektorkontrolle, die einen mittleren  $P_{\text{coeff}}$  (FDS) von  $3,38 \cdot 10^{-6}$  cm/s aufwies, etwa um den Faktor 2 erhöht.



**Abbildung 23: Die Aminosäuren R145, Y148, K157, Y158 und E159 von Cld5 sind für die parazelluläre Dichtigkeit gegenüber FDS essentiell.** MDCK-II-Zellklone, die die angegebenen FLAG-Cld5-Proteine stabil exprimierten, wurden auf Filtern ausgesät. Für jedes FLAG-Cld5-Protein wurden mindestens zwei Klone und zehn Filter verwendet. Nach vier Tagen wurde der TER gemessen. Nachdem die Zellen einen konstanten TER erreicht hatten, wurden die Permeationsmessungen durchgeführt. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Vektorkontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n \geq 10$ .

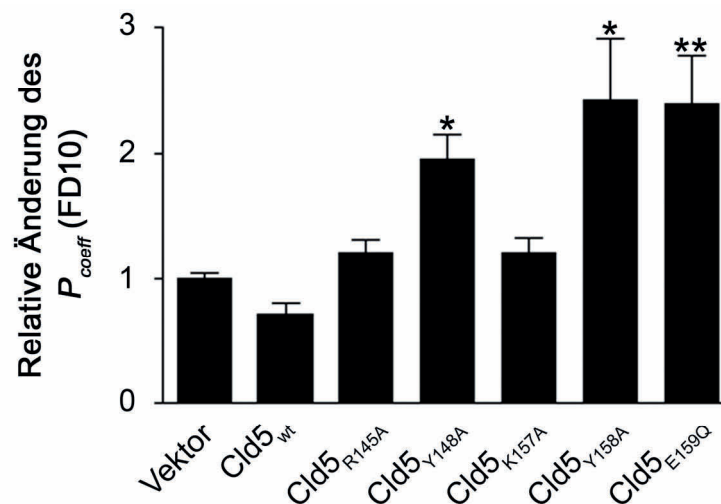
Zusammenfassend führte die stabile Transfektion von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> in MDCK-II-Zellen zur Reduktion der parazellulären Permeation von FDS bzw. zur Erhöhung der parazellulären Dichtigkeit gegenüber FDS. Im Gegensatz zu den TER-Messungen aus 3.1.7.1 entsprachen bei den FDS-Permeationsmessungen die Permeationskoeffizienten der MDCK-II-Zellklone, die Cld5-Mutanten exprimierten, nicht den Permeationskoeffizienten der Vektorkontrollen, sondern waren erhöht. Folglich führten die untersuchten Mutationen nicht nur zum Verlust der abdichtenden Wirkung von Cld5<sub>wt</sub> gegenüber der parazellulären Dichtigkeit von FDS, sondern auch zur Aufhebung weiterer, gegen FDS abdichtender Funktionen.



### 3.1.6.3 Bedeutung für die parazelluläre Permeation von 10 kDa-Fluoresceinisothiocyanat-Dextran

Da bereits bekannt ist, dass Cld5 den parazellulären Spalt gegen Moleküle  $< 800$  Da abdichtet [Nitta, 03], wurden mit FDS (376 Da) ein Molekül unterhalb dieser Größenordnung ausgewählt. Nun sollte untersucht werden, ob R145, Y148, K157, Y158 und E159 von Cld5 auch für die Abdichtung gegen die parazelluläre Permeation noch größerer Moleküle relevant sind. Dafür wurden Permeationsversuche mit FD10 durchgeführt. Wie bereits für FDS beschrieben, weist auch FD10 keine zytotoxische Wirkung auf und beeinträchtigt die Integrität des *Monolayers* nicht [O'goshi, 06].

Bei MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub> stabil exprimierten, betrug der  $P_{coeff}$  (FD10)  $2,63 \cdot 10^{-7} \pm 3,13 \cdot 10^{-8}$  cm/s. Dieser war zwar geringer als der mittlere  $P_{coeff}$  (FD10) der Vektorkontrolle ( $3,72 \cdot 10^{-7} \pm 3,13 \cdot 10^{-8}$  cm/s), dennoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Abbildung 24, Tabelle S24 im Anhang). Im Gegensatz zu Cld5<sub>wt</sub> wiesen alle MDCK-II-Zellklone, die mutierte Cld5-Proteine exprimierten, die dem Phänotyp der *disjunction*-Mutante zugeordnet werden (Cld5<sub>Y148A</sub>, Cld5<sub>Y158Y</sub> und Cld5<sub>E159Q</sub>) im Vergleich zur Vektorkontrolle eine signifikant höhere Permeabilität gegenüber FD10 auf ( $p < 0,05$  für Cld5<sub>Y148A</sub> und Cld5<sub>Y158Y</sub>,  $p < 0,01$  für Cld5<sub>E159Q</sub>). Die Permeation von FD10 war bei diesen drei Cld5-Mutanten im Vergleich zur Vektorkontrolle um die Faktoren 2 bis 2,5 erhöht. Im Gegensatz zur parazellulären Permeation von FDS, bei der mit allen Cld5-Mutanten ein erhöhter  $P_{coeff}$  (FDS) beobachtet wurde, hatten nicht alle untersuchten Cld5-Mutationen einen Einfluss auf die parazelluläre Permeation von FD10. Die intrazelluläre Cld5<sub>K157A</sub>-Mutante sowie die Mutante vom TJ-Typ Cld5<sub>R145A</sub> wiesen zwar im Vergleich zur Vektorkontrolle höhere Permeationskoeffizienten auf, jedoch waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant (Abbildung 24, Tabelle S24 im Anhang).



**Abbildung 24: Die Aminosäuren Y148, Y158 und E159 von Cld5 sind für die parazelluläre Dichtigkeit gegenüber FD10 essentiell.** MDCK-II-Zellklone, die die angegebenen FLAG-Cld5-Proteine stabil exprimierten, wurden auf Filtern ausgesät. Für jedes FLAG-Cld5-Protein wurden mindestens zwei Klone und neun Filter verwendet. Nach vier Tagen wurde der TER gemessen. Nachdem die Zellen einen konstanten TER erreicht hatten, wurden die Permeationsmessungen durchgeführt. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Vektorkontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n \geq 10$ .

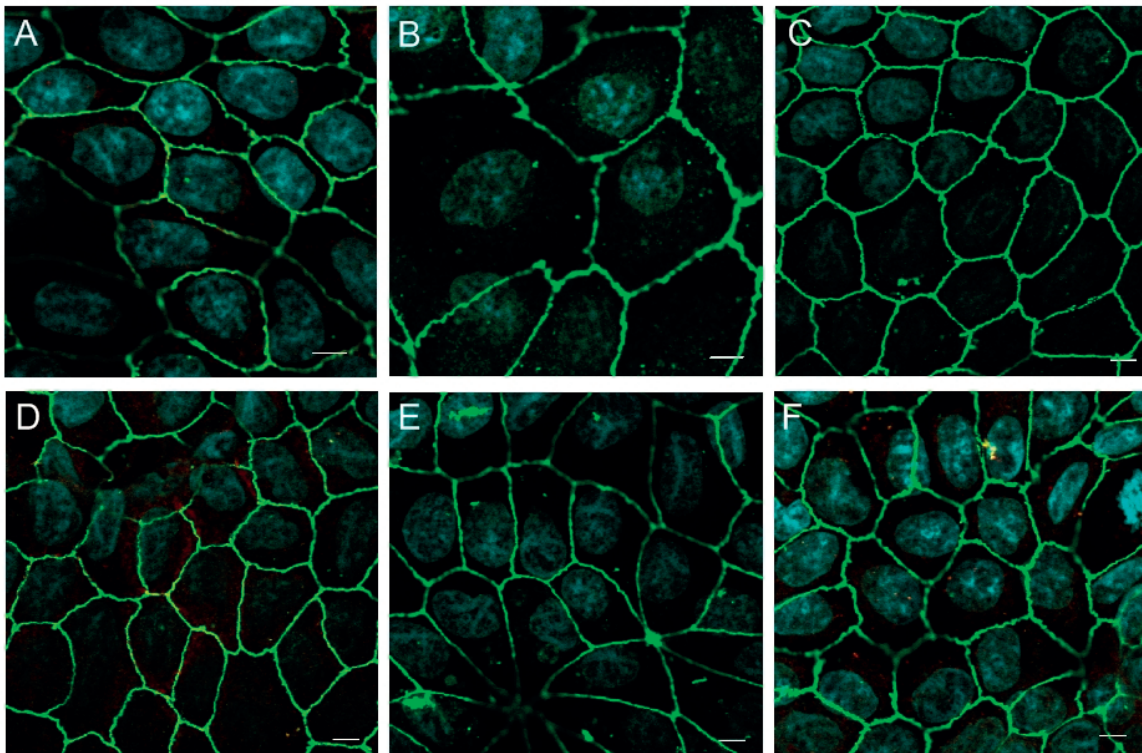
Zusammenfassend hatte die stabile Transfektion von MDCK-II-Zellen mit Cld5<sub>wt</sub>, Cld5<sub>R145A</sub> und Cld5<sub>K157A</sub> keine veränderte parazelluläre Permeation von FD10 zur Folge. Folglich dichten die von diesen Zellen ausgebildeten TJ den parazellulären Spalt gegenüber großen Molekülen im Vergleich zur Vektorkontrolle vergleichbar ab. Die drei *disjunction*-Mutanten Cld5<sub>Y148</sub>, Cld5<sub>Y158A</sub> und Cld5<sub>E159Q</sub> wiesen jedoch im Vergleich zur Vektorkontrolle eine signifikant höhere parazelluläre Permeation von FD10 auf.

### 3.1.7 Bedeutung einzelner Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die Expression und subzelluläre Lokalisation von *tight junction*-Proteinen

#### 3.1.7.1 Periphere *tight junction*-Proteine: ZO-1

Nun sollte untersucht werden, ob die Aminosäuresubstitutionen in der 2. EZS von FLAG-Cld5 die Expression oder subzelluläre Lokalisation peripherer TJ-Proteine beeinflussen. Dafür wurden die Expressionsstärke und die subzelluläre Lokalisation von ZO-1 in den MDCK-II-Zellklonen, die verschiedene FLAG-Cld5-Proteine stabil exprimierten, mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert.

In allen MDCK-II-Zellklonen wurden ZO-1-Signale gleicher Intensität beobachtet. Ferner war das ZO-1-Signal stets kontinuierlich über die gesamte Plasmamembran verteilt (Abbildung 25). Es wurden keine Unterschiede zwischen Cld5<sub>wt</sub> und den Cld5-Mutanten detektiert. Folglich waren die Aminosäuren R145, Y148, K157, Y158 und E159 von Cld5 für die Expression und subzelluläre Lokalisation von ZO-1 nicht relevant.



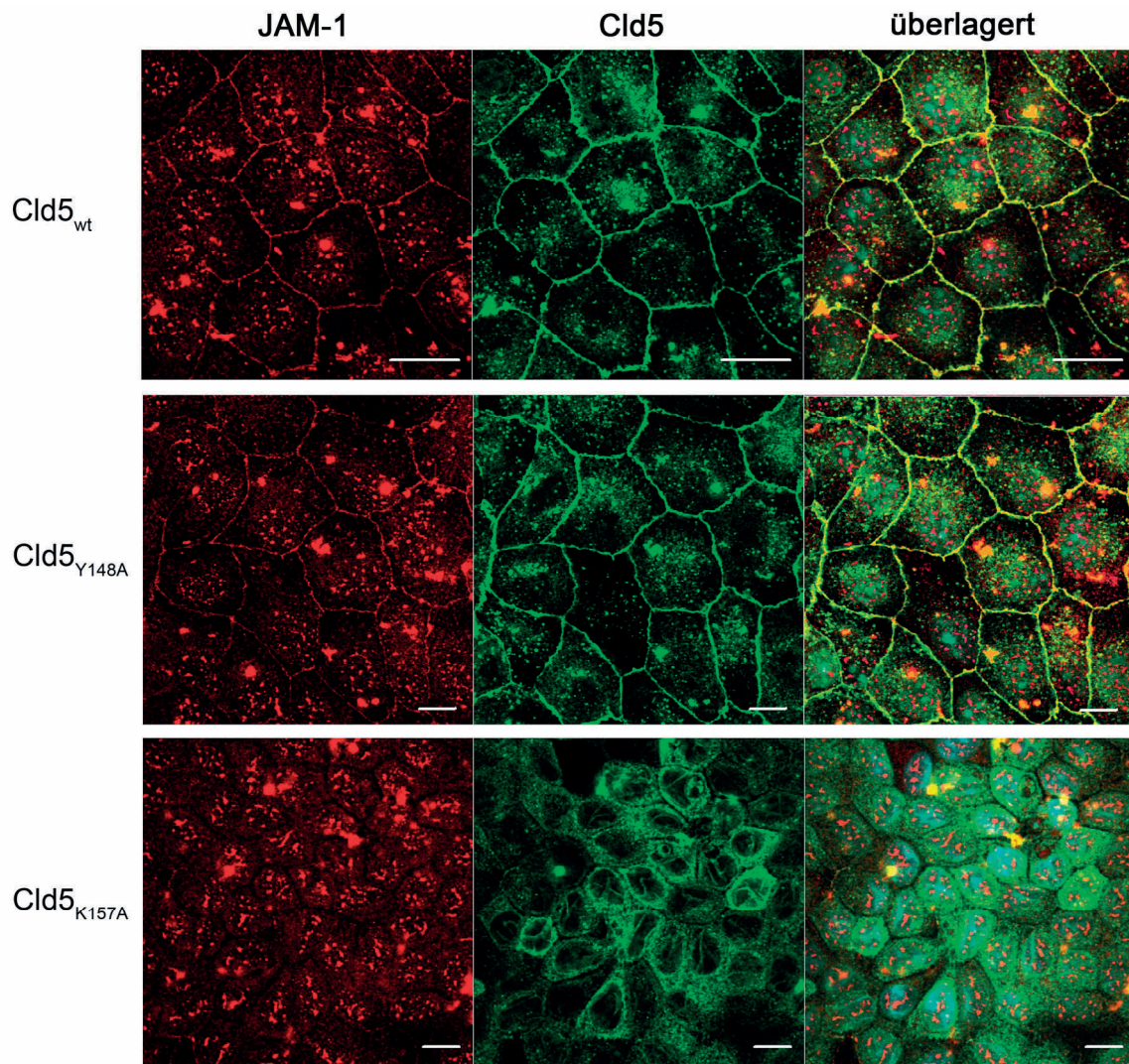
**Abbildung 25: R145, Y148, K157, Y158 und E159 von Cld5 sind für die Expression und subzelluläre Lokalisation von endogenem ZO-1 in FLAG-Cld5 stabil exprimierenden MDCK-II-Zellen nicht relevant.** MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub> (A), FLAG-Cld5<sub>R145A</sub> (B), FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> (C), FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> (D), FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> (E) oder FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> (F) stabil exprimierten, wurden fünf Tage auf Deckgläsern kultiviert. Anschließend wurde ZO-1 (grün) mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 5 µm.

### 3.1.7.2 Transmembranale *tight junction*-Proteine: JAM-1

Anschließend sollte untersucht werden, ob die Aminosäuresubstitutionen der 2. EZS von FLAG-Cld5-Proteinen die Expression oder subzelluläre Lokalisation transmembranaler TJ-Proteine beeinflusst. Untersuchungen zur Co-Lokalisation der stabil exprimierten FLAG-Cld5-Proteine mit endogenem Occludin (Abbildung 19) bzw. Cld1 (Abbildung 20) hatten bereits gezeigt, dass die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuresubstitutionen von FLAG-Cld5 die Expression und subzelluläre Lokalisation dieser TJ-Proteine nicht veränderten. Daher sollte im Folgenden die Expression und subzelluläre Lokalisation von



JAM-1, einem weiteren transmembranalen TJ-Protein, mittels Immunfluoreszenzfärbung stabiler MDCK-II-Zellen analysiert werden. Dabei wurde beobachtet, dass die stabile Expression von FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>, nicht jedoch von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> bzw. FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>, zum fast vollständigen Verlust der Plasmamembranlokalisation von JAM-1 führt, (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Die stabile Transfektion von MDCK-II-Zellen mit FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> führte im Gegensatz zu FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> zum Verlust der Plasmamembranlokalisation von JAM-1. MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> oder FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> stabil exprimierten, wurden fünf Tage auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden JAM-1 (rot) und Cld5 (grün) mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Stellen der Co-Lokalisation von JAM-1 und Cld5 ergaben in der Überlagerung gelbe Signale. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt. Maßstab: 10 µm.



### 3.1.8 Bedeutung einzelner Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die Morphologie von *tight junction*-Strängen

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Aminosäuresubstitutionen in der 2. EZS von FLAG-Cld5 die Morphologie der TJ-Stränge von MDCK-II-Zellen beeinflussen. Dafür wurden die TJ-Stränge von MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, FLAG-Cld5<sub>R145A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> bzw. den Kontrollvektor stabil exprimierten, mittels Gefrierbruchelektronenmikroskopie analysiert (2.3.11). Die TJ-Stränge dieser Zellen unterschieden sich weder hinsichtlich ihrer Anzahl noch hinsichtlich ihrer Länge und Quervernetzung. Alle TJ-Stränge waren mit der protoplasmatischen Hälfte der Plasmamembran assoziiert (Abbildung 27).

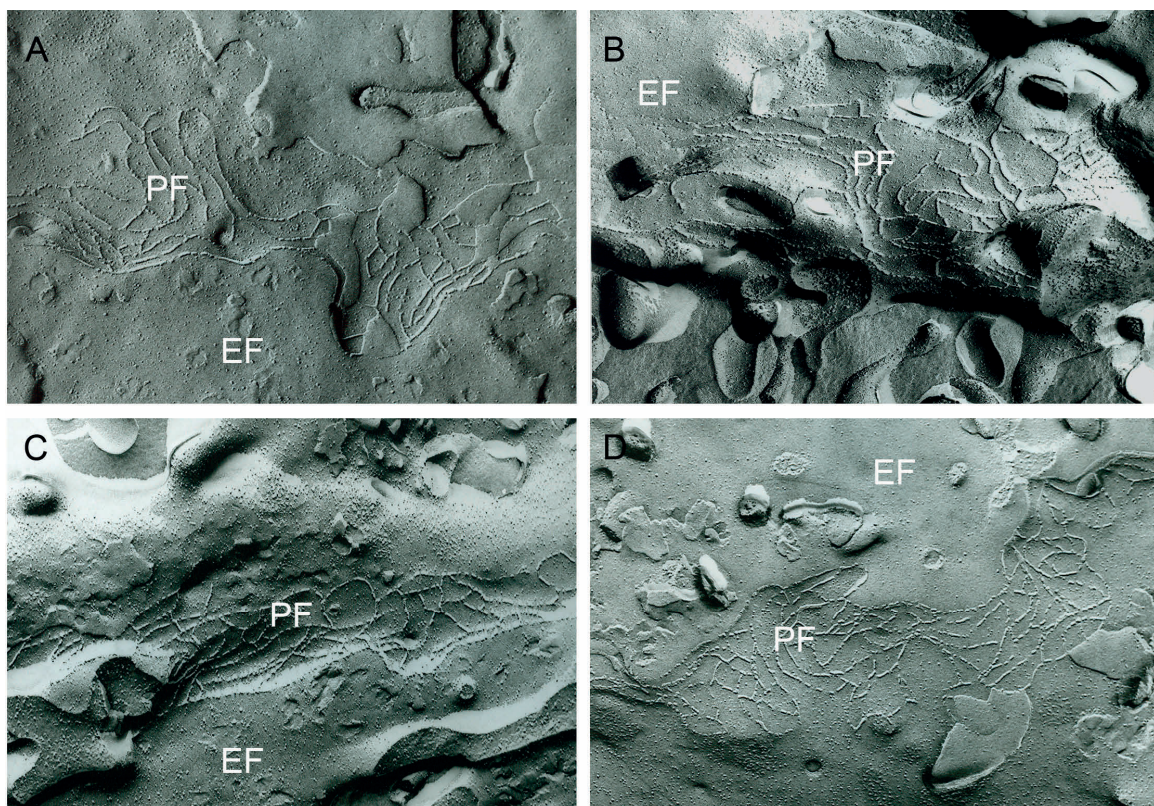


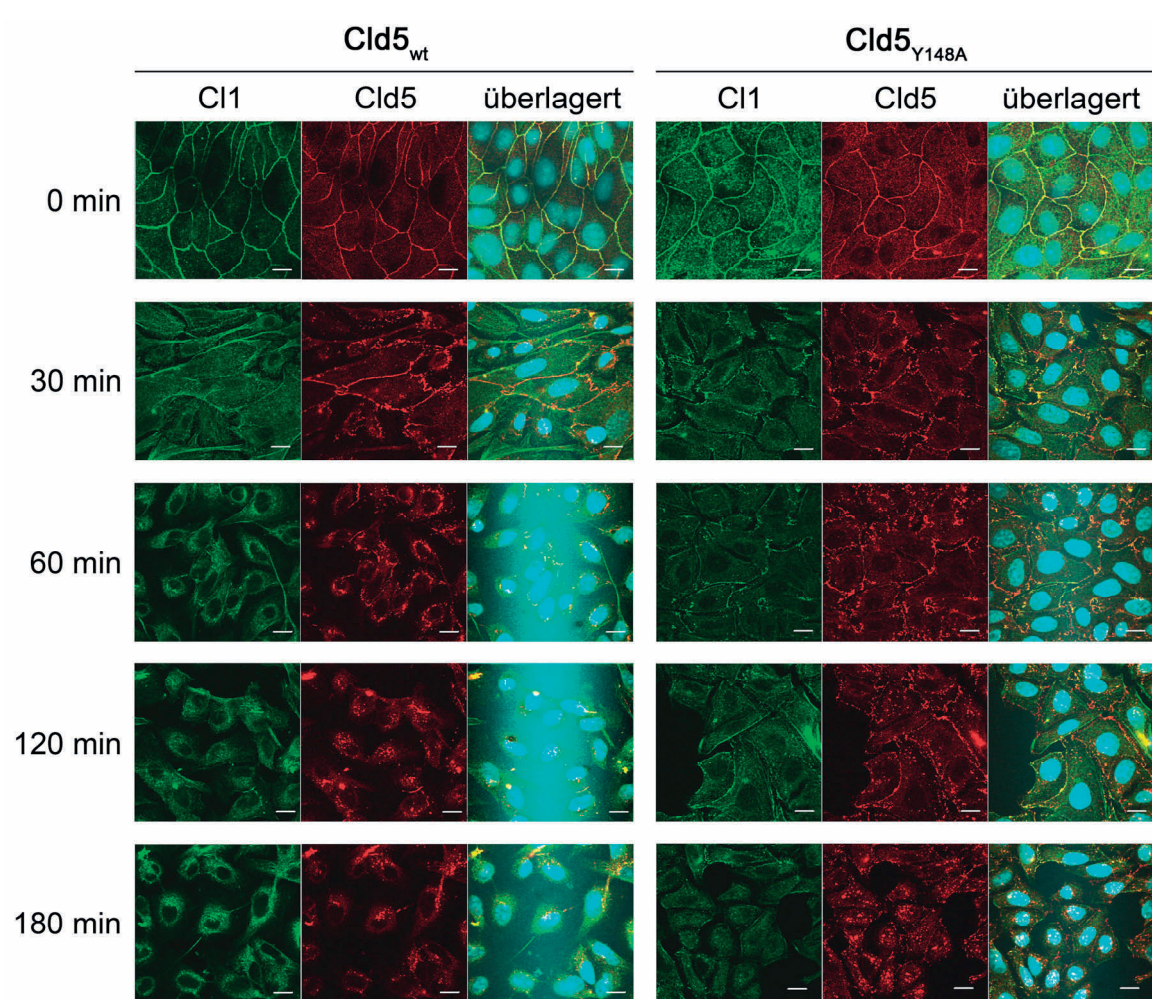
Abbildung 27: **Die Expression der verschiedenen FLAG-Cld5-Proteine hat auf die Strangmorphologie der TJ von MDCK-II-Zellen keinen Einfluss.** Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahmen von MDCK-II-Zellen, die den Kontrollvektor (A), FLAG-Cld5<sub>wt</sub> (B), Flag-Cld5<sub>R145A</sub> (C) und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> (D) exprimierten. PF kennzeichnet die protoplasmatische und EF die exoplasmatische Hälfte der Plasmamembran.

### **3.1.9 Rolle des Y148 von Claudin-5 beim $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Ab- und Aufbau von *tight junctions***

Im Folgenden sollte die Bedeutung von Aminosäuren der 2. EZS von Cld5, deren Austausch in HEK-293-Zellen zum Verlust der Cld5-Kontaktanreicherung in der Plasmamembran führt, für den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Abbau und Wiederaufbau von TJ untersucht werden (2.4.7). Dabei wurde die Rolle des Y148 von Cld5 exemplarisch für alle Cld5-*disjunction*-Mutanten analysiert.

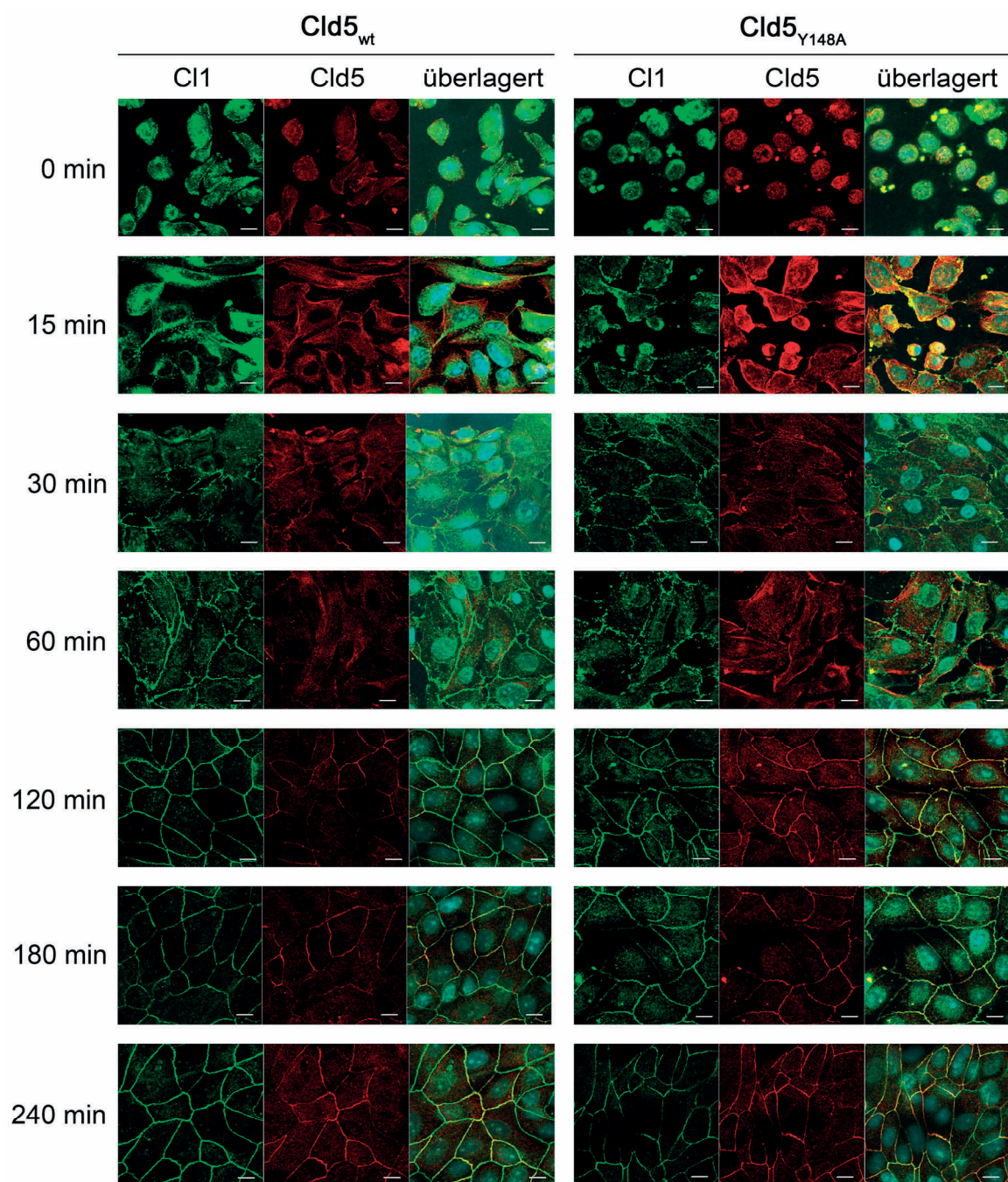
Nach dem Entzug von  $\text{Ca}^{2+}$  wurde sowohl bei FLAG-Cld5<sub>wt</sub> als auch bei FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> ein Verlust der Plasmamembranlokalisation beobachtet (Abbildung 28). Dabei unterschieden sich beide Proteine hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs des Verlusts der Plasmamembranlokalisation nicht. In einigen Versuchen wurde Cld5<sub>Y148A</sub> im Vergleich zu Cld5<sub>wt</sub> tendenziell etwas langsamer aus der Plasmamembran abgereichert. Allerdings wiesen auch die Zellen auf einem Deckgläschen unterschiedliche Zeitverläufe des Verlusts der Plasmamembranlokalisation auf. Daher konnte der tendenziell langsamere Verlust der Plasmamembranlokalisation des FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> nicht eindeutig auf die Substitutionsmutation zurückgeführt werden. Folglich sprechen die Ergebnisse dafür, dass Y148 von Cld5 für den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Verlust der Plasmamembranlokalisation Cld5 nicht relevant ist.





**Abbildung 28: Y148 von Cld5 ist nicht an der Regulierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Internalisierung von Cld5 beteiligt.** MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub> oder FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> stabil exprimierten, wurden zunächst in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem MDCK-II-Standardmedium kultiviert und zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz auf  $\text{Ca}^{2+}$ -freies Medium umgestellt. Die Zellen wurden sofort danach oder 30, 60, 120 und 180 min später fixiert. Cld1 (grün) und Cld5 (rot) wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Die Überlagerung der beiden Signale erschien gelb. Die Zellkerne (blau) wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt. Maßstab: 5  $\mu\text{M}$ .

Auch beim Wiederaufbau der TJ nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug und erneuter  $\text{Ca}^{2+}$ -Zufuhr wurden zwischen FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> keine Unterschiede beobachtet (Abbildung 29). Nach 30- bzw. 120-minütiger Inkubation in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem MDCK-II-Standardmedium wurden die ersten Cld1- bzw. Cld5-Signale in der Plasmamembran beider stabil transfizierter MDCK-II-Zelllinien detektiert. Folglich ist Y148 von Cld5 nicht am  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Wiedereinbau von Cld5 in die TJ beteiligt.

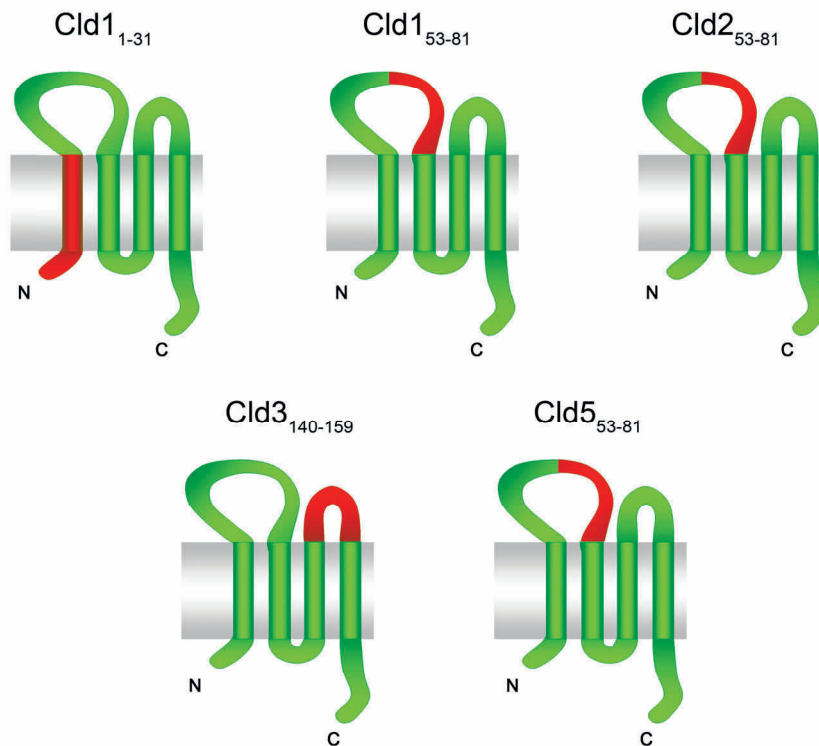


**Abbildung 29: Y148 von Cld5 ist nicht am  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Wiedereinbau von Cld5 in die TJ beteiligt.** MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub> oder FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> stabil exprimierten, wurden zunächst in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem MDCK-II-Standardmedium kultiviert. Zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz wurden sie 16 h in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem S-MEM kultiviert. Anschließend wurde das S-MEM gegen MDCK-II-Standardmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden sofort danach oder 15, 30, 60, 120, 180 und 240 min später Zellen fixiert. Cld1 (grün) und Cld5 (rot) wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Die Zellkerne (blau) wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt. FLAG-Cld5<sub>wt</sub> oder FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> wurden mit ähnlicher Geschwindigkeit in die TJ reintegriert. Maßstab: 5  $\mu\text{M}$ .



### 3.2 *Tight junction-modulierende Peptide*

Im Folgenden sollte die Wirkung der Peptide Cld1<sub>53-81</sub>, Cld2<sub>53-81</sub>, Cld5<sub>53-81</sub>, Cld3<sub>140-159</sub> und Cld1<sub>1-31</sub> (Abbildung 30) sowie eines Peptids, dessen Sequenz bis auf vier zusätzliche Lysine am N-Terminus der 2. TMD des Glycinrezeptors entsprach (GlyR-TDM), auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen untersucht werden.



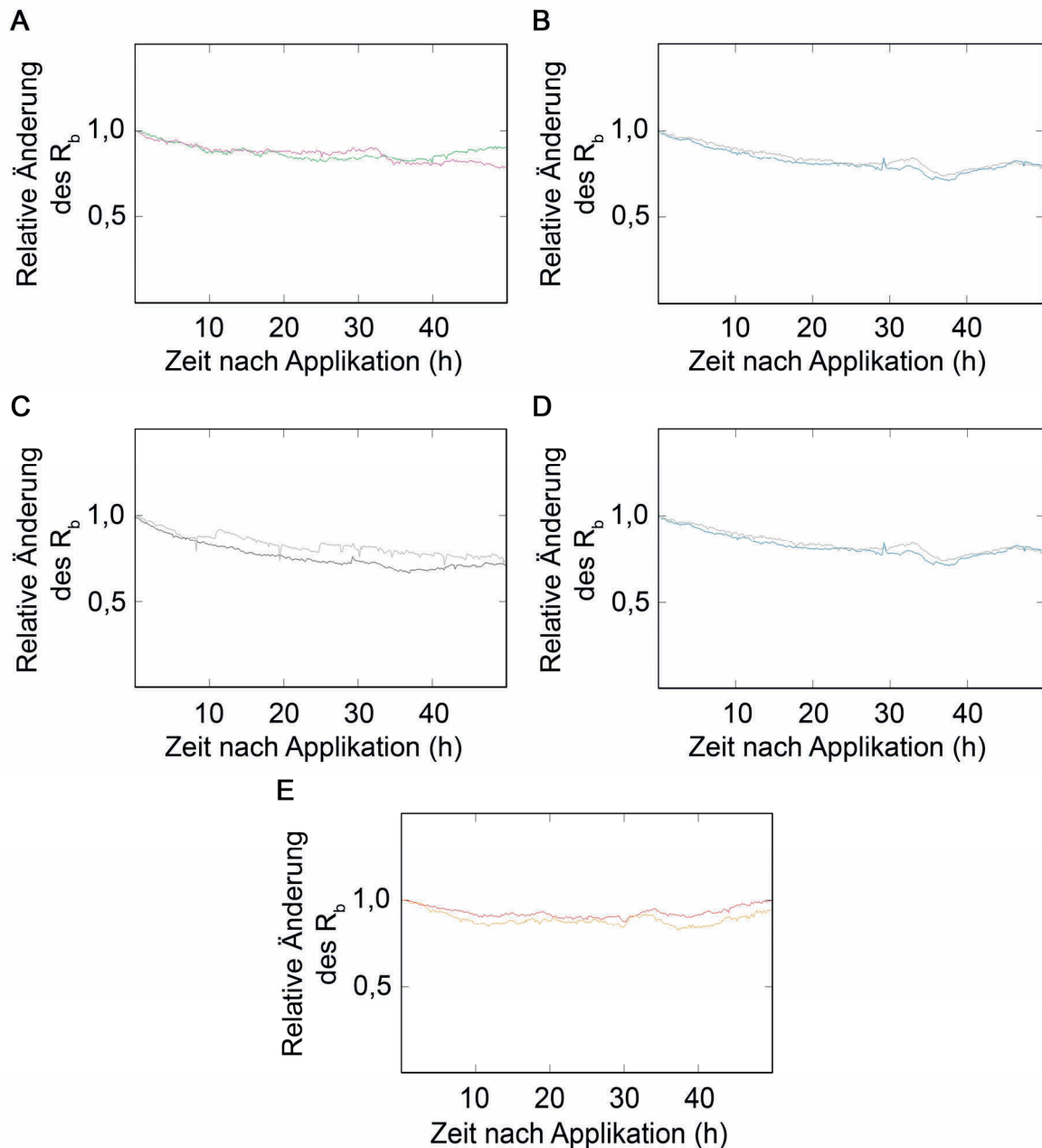
**Abbildung 30: Übersicht über die verwendeten Claudinpeptide.** Der Abschnitt der Claudine, der als Vorlage für die jeweiligen Peptide diente, ist rot markiert.

#### 3.2.1 Wirkung von Claudinpeptiden auf den parazellulären Widerstand von Epithelzellen im *Electric cell-substrate Impedance Sensing-System*

Um eine eventuelle Reduktion des parazellulären Widerstands detektieren zu können, wurden für diese Experimente Zelllinien eingesetzt, die hohe TER-Werte ausbilden. In entsprechenden Vorversuchen erwiesen sich neben den MDCK-II-Zellen auch Caco-2-Zellen als geeignet (Abbildung 11).

Die Zellen wurden zunächst in die Kammern von ECIS-Trägern eingesät und der Widerstand in Echtzeit gemessen (2.4.2). Sobald die Zellen einen konfluenten *Monolayer* ausbildeten und damit einen konstanten Widerstand aufwiesen, wurden sie von der apikalen

Seite mit 100, 200, 400  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Claudinpeptids behandelt. Sowohl bei Caco-2-Zellen (Abbildung 31) als auch bei MDCK-II-Zellen (Daten nicht gezeigt) wurde der Widerstand durch die Behandlung mit Claudinpeptiden im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert.



**Abbildung 31: Die apikal applizierten Claudinpeptide beeinflussen den  $R_b$  von Caco-2-Zellen im ECIS-System nicht.** Caco-2-Zellen wurden auf ECIS-Trägern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* apikal mit 400  $\mu\text{M}$  Cld1<sub>53-81</sub> (grün) (A), Cld2<sub>53-81</sub> (blau) (B), Cld5<sub>53-81</sub> (schwarz) (C), Cld3<sub>140-159</sub> (rot) (D) oder Cld1<sub>1-31</sub> (rot) (E) behandelt. Die zweite Kurve in jeder Abbildung repräsentiert den parazellulären Widerstand der Kontrolle. Die parazellulären Widerstände der peptidbehandelten Caco-2-Zellen unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle gemäß Mann-Whitney-U-Test,  $n = 6$ .

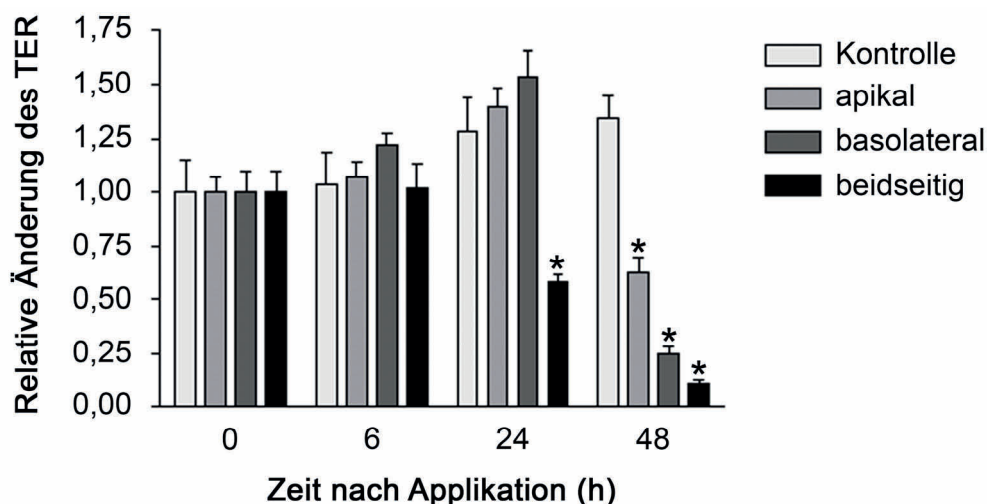
### 3.2.2 Wirkung von Claudinpeptiden auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen im Filterkultursystem

Zellen, die auf ECIS-Trägern ausgesät werden, können aufgrund der Konstruktion der ECIS-Träger nur von apikaler Seite behandelt werden. Im Gegensatz dazu ermöglicht das Filterkultursystem die Behandlung von Zellen sowohl von apikaler als auch von basolateraler Seite. Außerdem gestattet nur das Filterkultursystem, nicht aber das ECIS-System, die Messung der parazellulären Permeation von Molekülen wie FDS und FD10.

Daher sollte im Folgenden die Wirkung der Claudinpeptide auf die parazelluläre Dichtigkeit im Filterkulturmodell untersucht werden. Damit sollte eine mögliche basolaterale Wirkung der Claudinpeptide identifiziert und ihre fehlende apikale Wirkung verifiziert werden. Caco-2- und MDCK-II-Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und mit 300  $\mu$ M Cld1<sub>53-81</sub>, Cld2<sub>53-81</sub>, Cld5<sub>53-81</sub>, Cld3<sub>140-159</sub>, GlyR-TDM oder Cld5<sub>1-31</sub>, behandelt.

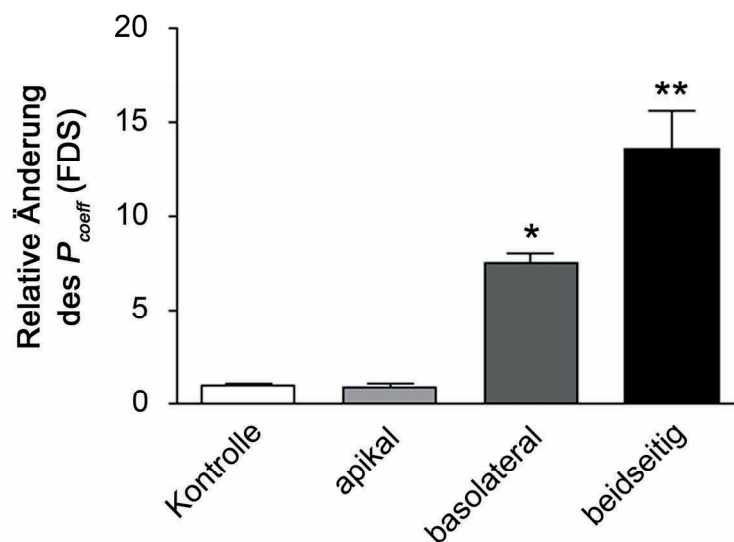
#### 3.2.2.1 Claudin-1<sub>53-81</sub>

Cld1<sub>53-81</sub> führte bei beidseitiger Behandlung von Caco-2-Zellen nach 24 h im Vergleich zur Kontrolle zur signifikanten Reduktion des TER (Abbildung 32). Wurde Cld1<sub>53-81</sub> apikal oder basolateral appliziert, war der TER der Caco-2-Zellen erst 48 h nach der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert.



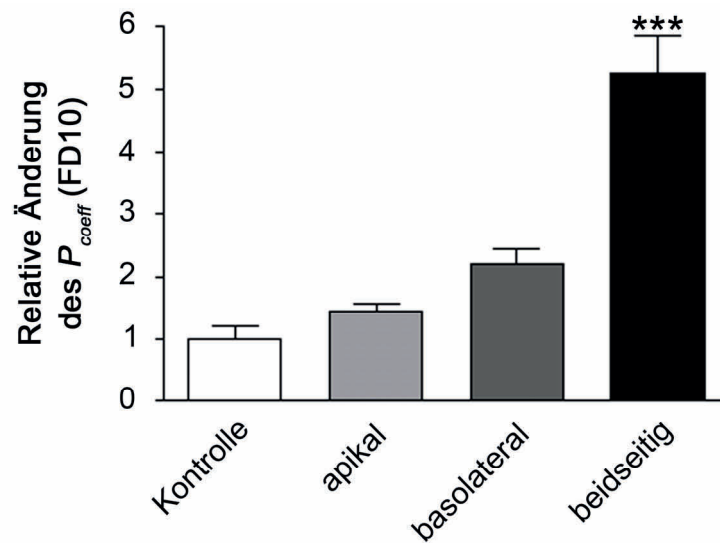
**Abbildung 32: Cld1<sub>53-81</sub> reduziert den TER von Caco-2-Zellen bei basolateraler oder beidseitiger Applikation, jedoch nicht bei apikaler Zugabe.** Caco-2-Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* apikal, basolateral oder beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld1<sub>53-81</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.01$  im Vergleich zur Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's *post-Test*,  $n \geq 6$ .

Im Anschluss an die 48-stündige Inkubation der Caco-2-Zellen mit Cld1<sub>53-81</sub> wurden neben der TER-Messung auch Permeationsmessungen mit FDS und FD10 durchgeführt. Die parazelluläre Permeabilität der Caco-2-Zellen gegenüber FDS wurde durch apikal appliziertes Cld<sub>153-81</sub> im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert (Abbildung 33). Im Gegensatz dazu führte die basolaterale Applikation von Cld1<sub>53-81</sub> im Vergleich zur Kontrolle und im Vergleich zu den apikal behandelten Zellen zur Erhöhung der parazellulären Permeation von FDS um den Faktor 7,5. Die beidseitige Behandlung der Caco-2-Zellen mit Cld1<sub>53-81</sub> führte im Vergleich zur Kontrolle und zu den apikal behandelten Zellen zur Erhöhung des  $P_{coeff}$  (FDS) um den Faktor 13.



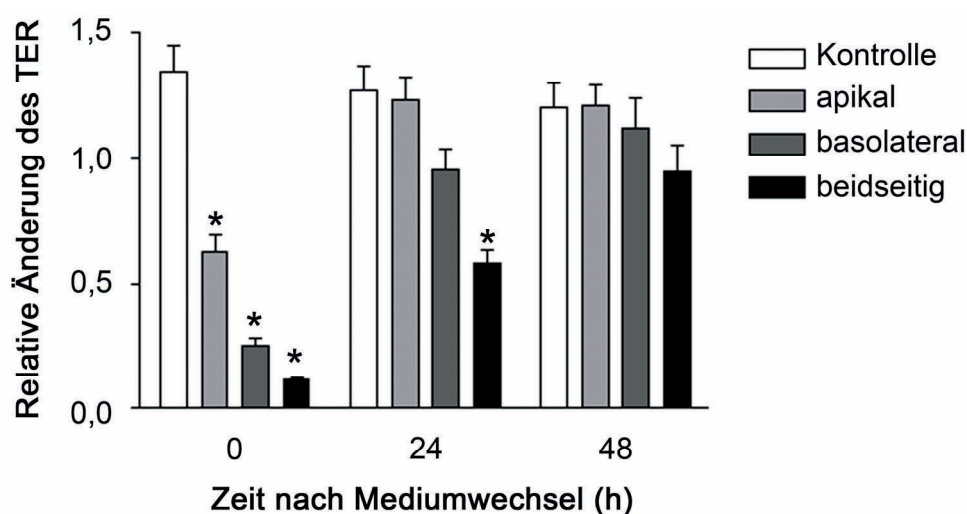
**Abbildung 33: Cld1<sub>53-81</sub> erhöht die parazelluläre Permeation von FDS bei Caco-2-Zellen bei basolateraler und beidseitiger Applikation.** Die Permeationsmessungen wurden im Anschluss an die 48-stündige Inkubation der Caco-2-Zellen mit 300  $\mu$ M Cld1<sub>53-81</sub> durchgeführt. Zellen, die basolateral oder beidseitig mit Cld1<sub>53-81</sub> behandelt wurden, wiesen im Vergleich zur Kontrolle und zu den apikal behandelten Zellen eine signifikant erhöhte parazelluläre Permeation von FDS auf Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n \geq 6$ ).

Die beidseitige Applikation von Cld1<sub>53-81</sub> führte auch zur Erhöhung der parazellulären Permeabilität der Caco-2-Zellen gegenüber FD10 (Abbildung 34). Bei apikaler oder basolateraler Applikation führte Cld1<sub>53-81</sub> im Vergleich zur Kontrolle zwar auch zur Erhöhung der parazellulären Permeation von FD10, jedoch war diese nicht statistisch signifikant.



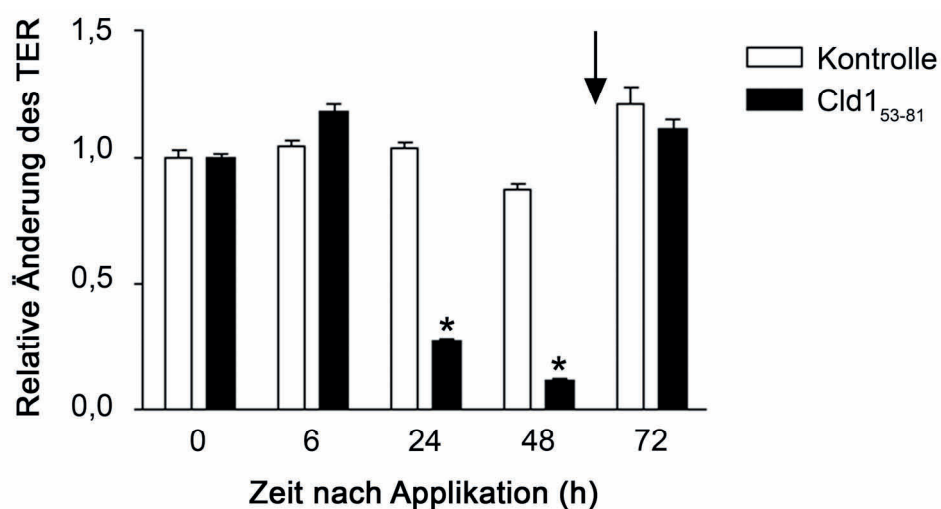
**Abbildung 34: Cld1<sub>53-81</sub> erhöht die parazelluläre Permeation von FD10 bei Caco-2-Zellen bei beidseitiger.** Die Permeationsmessungen wurden im Anschluss an die 48-stündige Inkubation der Caco-2-Zellen mit 300  $\mu\text{M}$  Cld1<sub>53-81</sub> durchgeführt. Nur die beidseitig behandelten Zellen wiesen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant erhöhte parazelluläre Permeation von FD10 auf (Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n \geq 6$ )

Um zu untersuchen, ob die Reduktion des TER durch basolateral oder beidseitig appliziertes Cld1<sub>53-81</sub> reversibel war, wurde im Anschluss an die Permeationsmessungen das Cld1<sub>53-81</sub> durch einen Mediumwechsel ausgewaschen. Nach weiterer 24- bzw. 48-stündiger Inkubation wurde der TER erneut gemessen. Während sich der TER der basolateral oder beidseitig behandelten Zellen 24 h nach dem Mediumwechsel noch signifikant von der Kontrolle unterschied, war dieser Unterschied 48 h nach dem Mediumwechsel nicht mehr signifikant (Abbildung 35). Folglich war die Reduktion des TER durch basolateral oder beidseitig appliziertes Cld1<sub>53-81</sub> ein reversibler Effekt.



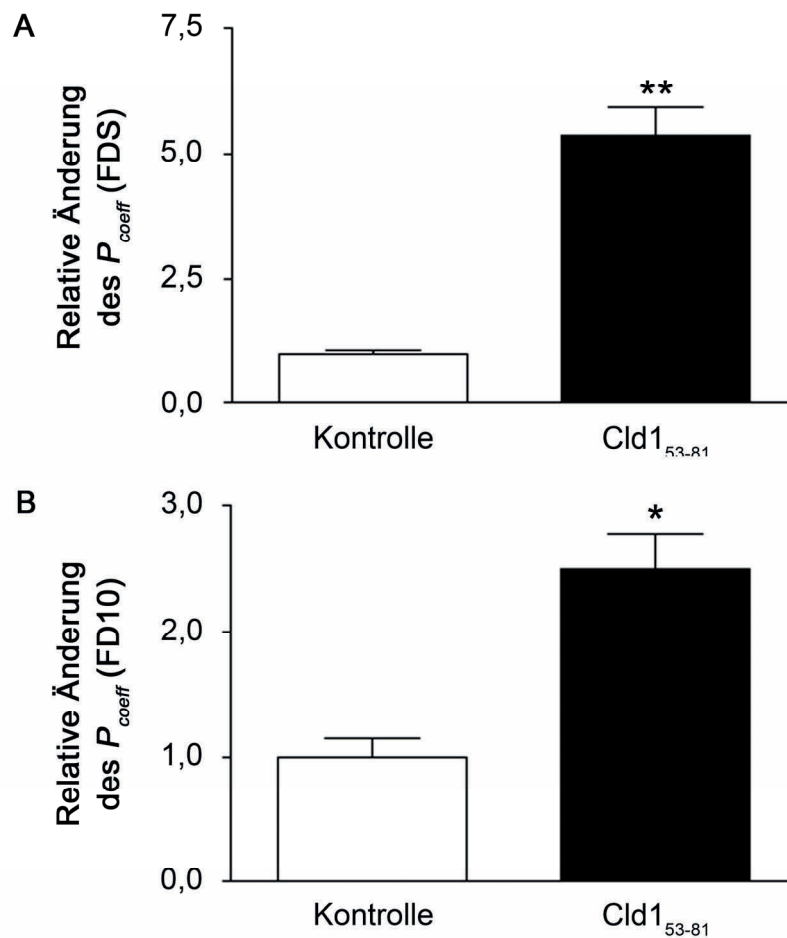
**Abbildung 35: Die Reduktion des TER von Caco-2-Zellen durch basolateral oder beidseitig appliziertes Cld1<sub>53-81</sub> ist reversibel.** Caco-2-Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* 48 h apikal, basolateral oder beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld1<sub>53-81</sub> behandelt. Im Anschluss wurde Cld1<sub>53-81</sub> durch einen Mediumwechsel ausgewaschen. Nach 48-stündiger Inkubation im peptidfreien Medium unterschied sich der TER der basolateral oder beidseitig behandelten Zellen nicht mehr signifikant von der Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's post-Test,  $n \geq 6$ .

Anschließend sollte untersucht werden, ob die Wirkung von Cld1<sub>53-81</sub> auf die parazelluläre Dichtigkeit für Caco-2-Zellen spezifisch ist oder auch bei anderen Cld1-exprimierenden Zelllinien auftritt. Dafür wurden MDCK-II-Zellen, die ebenfalls endogenes Cld1 exprimieren, beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld1<sub>53-81</sub> behandelt. Auch bei MDCK-II-Zellen führte beidseitig appliziertes Cld1<sub>53-81</sub> nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrolle zur signifikanten Reduktion des TER (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Beidseitig appliziertes Cld1<sub>53-81</sub> führt zur reversiblen Reduktion des TER von MDCK-II-Zellen.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld1<sub>53-81</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Die beidseitig behandelten MDCK-II-Zellen wiesen 24 und 48 h nach der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle einen signifikant reduzierten TER auf. Cld1<sub>53-81</sub> wurde nach 48 h durch einen Mediumwechsel ausgewaschen (Pfeil). Nach 24-stündiger Inkubation im peptidfreien Medium unterschied sich der TER der Zellen nicht mehr signifikant von der Kontrolle Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.0001$  im Vergleich zur Kontrolle gemäß Mann-Whitney-U-Test,  $n = 6$ .

Im Anschluss an die 48-stündige Inkubation der MDCK-II-Zellen mit Cld1<sub>53-81</sub> wurden neben der TER-Messung auch  $P_{coeff}$  (FDS) und  $P_{coeff}$  (FD10) bestimmt. Diese Messungen ergaben, dass Cld1<sub>53-81</sub> die parazelluläre Permeabilität von MDCK-II-Zellen sowohl gegenüber FDS als auch FD10 erhöht (Abbildung 37).



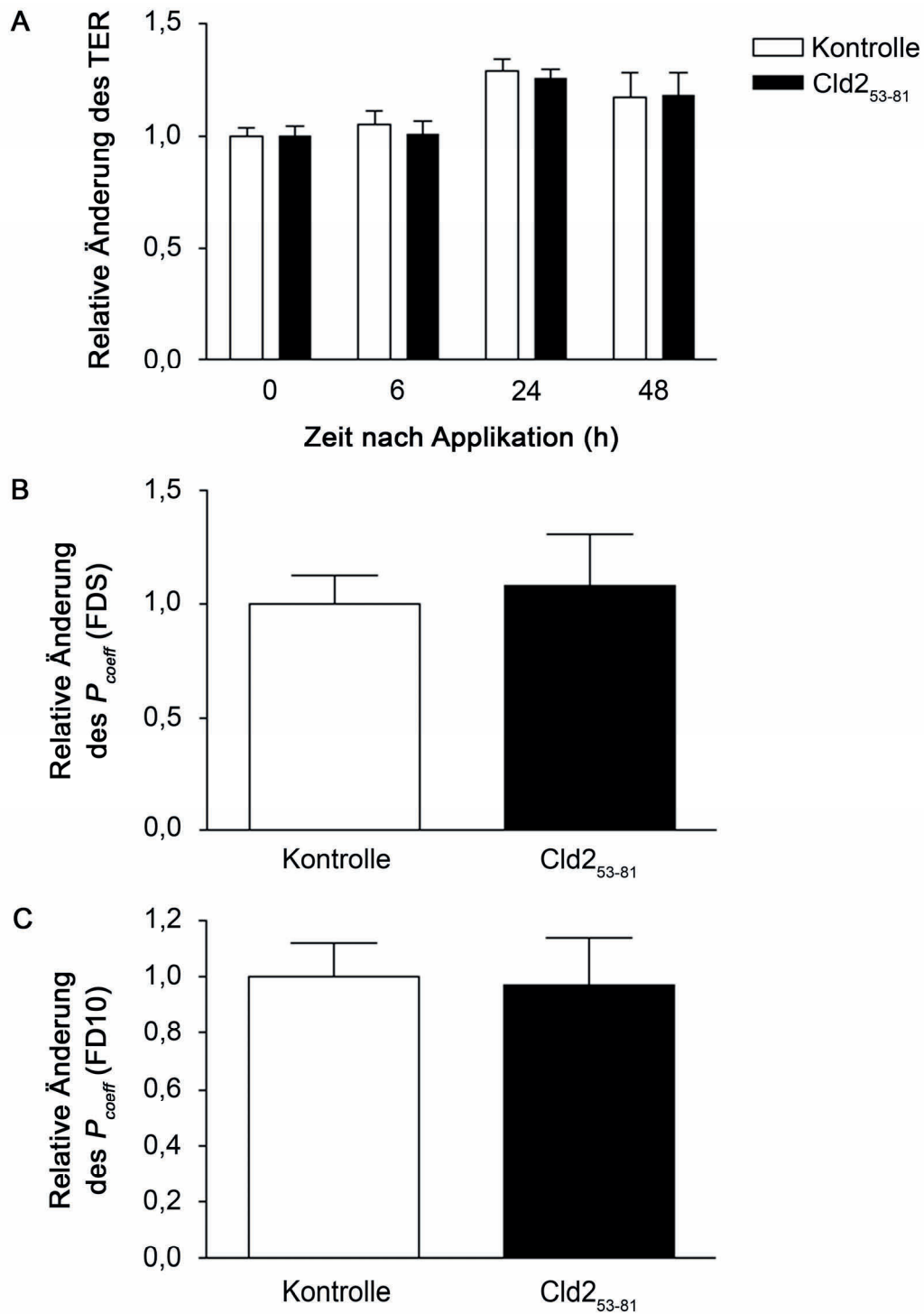
**Abbildung 37: Cld1<sub>53-81</sub> erhöht die parazelluläre Permeation von FDS und FD10 bei MDCK-II-Zellen.** Die Permeationsmessungen wurden im Anschluss an die 48-stündige Inkubation der MDCK-II-Zellen mit 300  $\mu\text{M}$  Cld1<sub>53-81</sub> durchgeführt (Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle und \*  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle gemäß Mann-Whitney-U-Test,  $n = 6$ ).

Zusammenfassend war die beidseitige Behandlung der Caco-2-Zellen mit Cld1<sub>53-81</sub> sowohl bezüglich der TER-Senkung als auch der Erhöhung der parazellulären Permeation von FDS und FD10 effektiver als die apikale oder basolaterale Behandlung. Folglich wurde die Wirkung der übrigen Claudinpeptide auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco-2-Zellen zunächst bei beidseitiger Applikation getestet. Nur im Fall einer signifikanten Wirkung bei beidseitiger Applikation sollte auch die Wirkung bei apikaler oder basolateraler Applikation getestet werden.



3.2.2.2 Claudin-2<sub>53-81</sub>

Die beidseitige Behandlung von Caco-2-Zellen mit 300  $\mu$ M Cld2<sub>53-81</sub> über 48 h führte im Vergleich zur Kontrolle weder zur signifikanten Änderung des TER noch zur Änderung der parazellulären Permeation von FDS und FD10 (Abbildung 38).

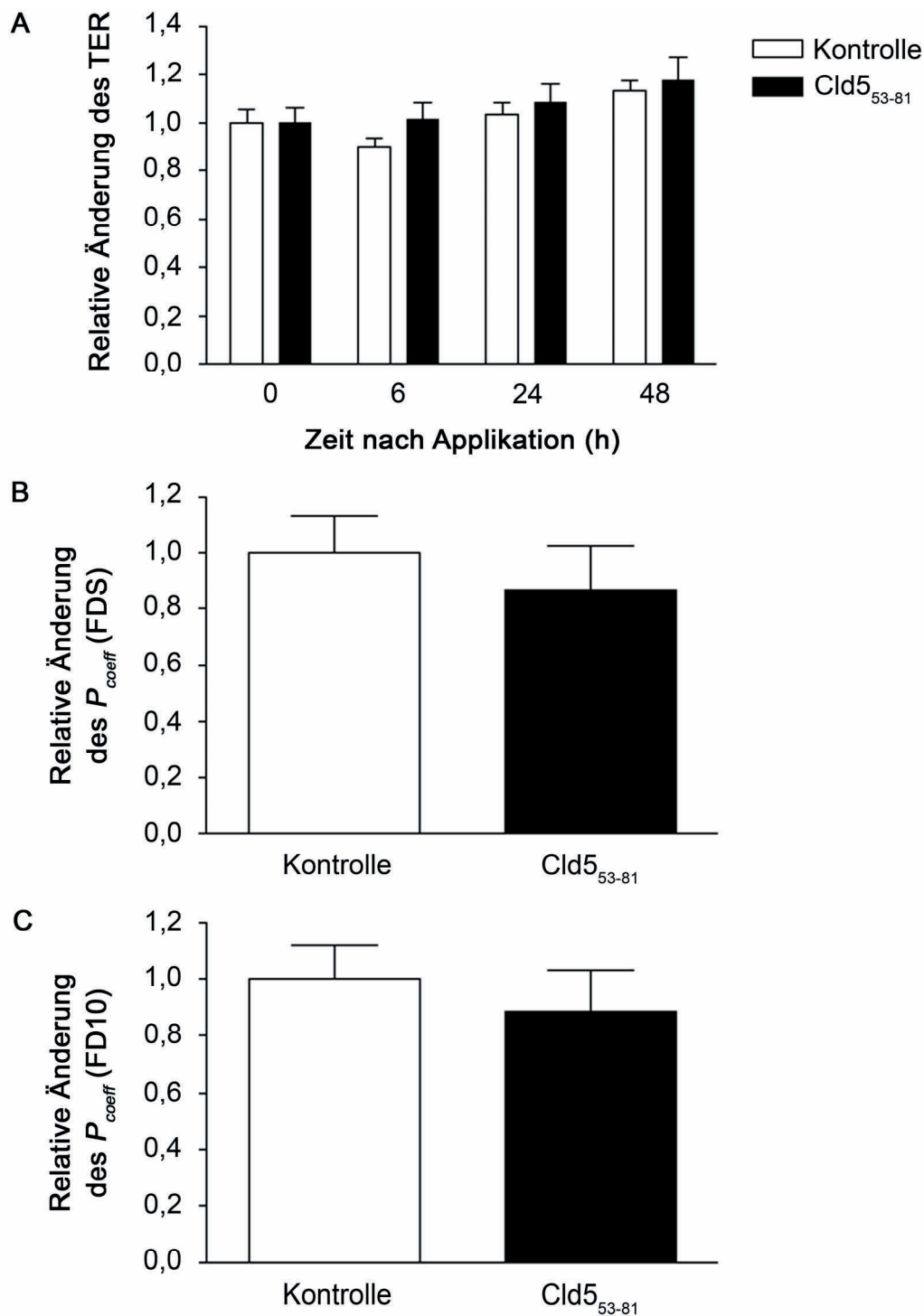


**Abbildung 38: Cld2<sub>53-81</sub> hat keinen Einfluss auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco-2-Zellen.** Caco-2-Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld2<sub>53-81</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen (**A**). Die Behandlung mit Cld2<sub>53-81</sub> (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zu keiner signifikanten Änderung des TER (Mittelwert  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*). Die parazelluläre Permeation von FDS (**B**) und FD10 (**C**) unterschied sich nach 48-stündiger Behandlung der Zellen mit Cld2<sub>53-81</sub> ebenfalls nicht signifikant von der Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test, n = 6.

Zusammenfassend hatte das Peptid Cld2<sub>53-81</sub> auf die parazelluläre Dichtigkeit der Caco-2-Zellen keinen Einfluss.

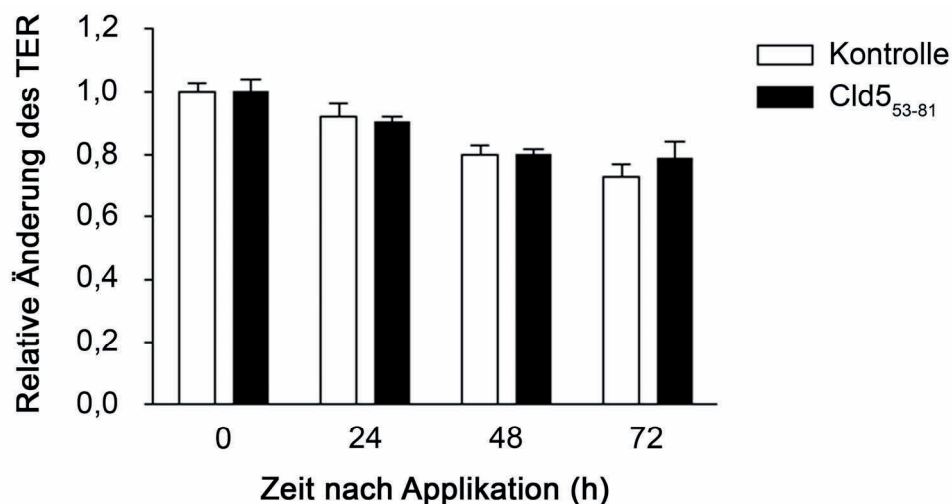
### 3.2.2.3 Claudin-5<sub>53-81</sub>

Ähnlich wie Cld2<sub>53-81</sub> hatte auch die beidseitige Behandlung von Caco-2-Zellen mit dem Peptid Cld5<sub>53-81</sub> bis zu 48 h im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Einfluss auf den TER oder die parazelluläre Permeation von FDS und FD10 (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Cld5<sub>53-81</sub> hat keinen Einfluss auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco-2-Zellen.** Caco-2-Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld5<sub>53-81</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen (**A**). Die Behandlung mit Cld5<sub>53-81</sub> (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zu keiner signifikanten Änderung des TER (Mittelwert  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post* Test). Die parazelluläre Permeation von FDS (**B**) und FD10 (**C**) unterschied sich nach 48-stündiger Behandlung der Zellen mit Cld2<sub>53-81</sub> ebenfalls nicht signifikant von der Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test, n = 6.

Da vermutet wurde, dass die Wirkung der Claudinpeptide auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen durch die Bindung des Peptids an das jeweils entsprechende zelluläre Claudin und anschließende Internalisierung des Komplexes vermittelt werden könnte, war es interessant, die Wirkung des Peptids Cld5<sub>53-81</sub> auf die parazelluläre Dichtigkeit der MDCK-II-Zellklone, die Cld5<sub>wt</sub> stabil exprimierten, zu untersuchen. Daher wurden diese stabilen Zelllinien ebenfalls 48 h beidseitig mit Cld5<sub>53-81</sub> behandelt. Es wurde jedoch keine signifikante Änderung des TER beobachtet (Abbildung 40).



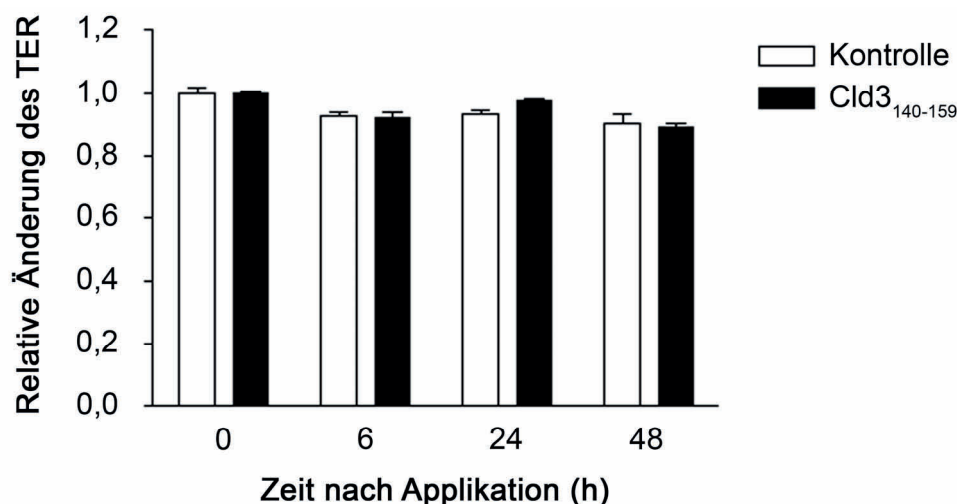
**Abbildung 40: Cld5<sub>53-81</sub> hat keinen Einfluss die parazelluläre Dichtigkeit von Cld5<sub>wt</sub> stabil exprimierenden MDCK-II-Zellen.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld5<sub>53-81</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 24, 48 und 72 h danach gemessen. Die beidseitige Behandlung mit Cld5<sub>53-81</sub> (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zu keiner signifikanten Änderung des TER. Mittelwert  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*, n = 6.

Zusammenfassend hatte von allen untersuchten Peptiden, deren Sequenz dem Abschnitt von der 53. bis zu der 81. Aminosäure aus der 1. EZS von Cld1, Cld2, Cld5 entsprach, nur das Peptid Cld1<sub>53-81</sub> eine Wirkung auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen.

#### 3.2.2.4 Claudin-3<sub>140-159</sub>

Anschließend sollte die Wirkung von Peptiden, deren Sequenz der 2. EZS von Claudinen nachempfunden war, auf die parazelluläre Permeation von Epithelzellen untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurde das Peptid Cld3<sub>140-159</sub> gewählt, das aufgrund der geringen Größe der 2. EZS von Cld3 die gesamte 2. EZS abdeckt. Allerdings hatte die

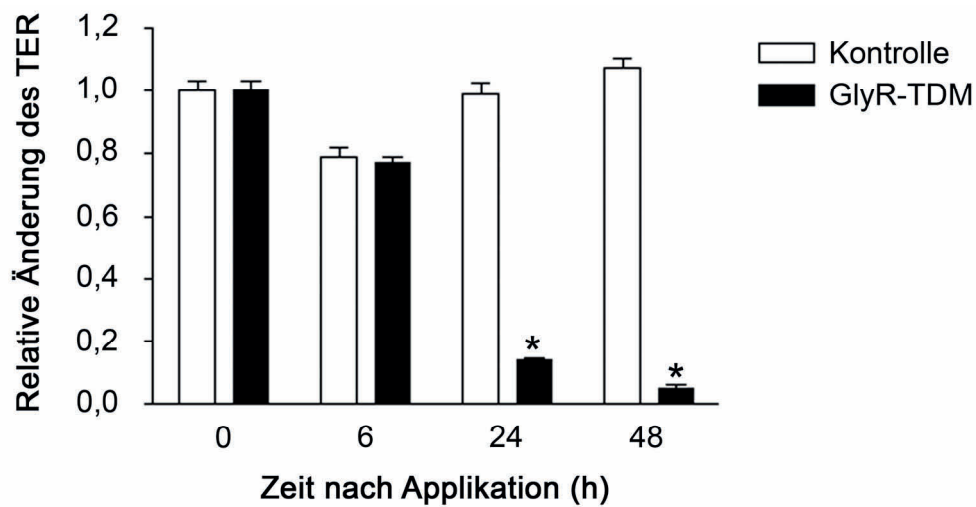
beidseitige Behandlung von Caco-2-Zellen mit 300  $\mu$ M Cld3<sub>140-159</sub> im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Wirkung auf den TER (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Cld3<sub>140-159</sub> hat keinen Einfluss auf den TER von Caco-2-Zellen.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M Cld3<sub>140-159</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Die Behandlung mit Cld3<sub>140-159</sub> (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zu keiner signifikanten Änderung des TER. Mittelwert  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n = 6$ .

### 3.2.2.5 Das Glycinrezeptorpeptid „GlyR-TDM“

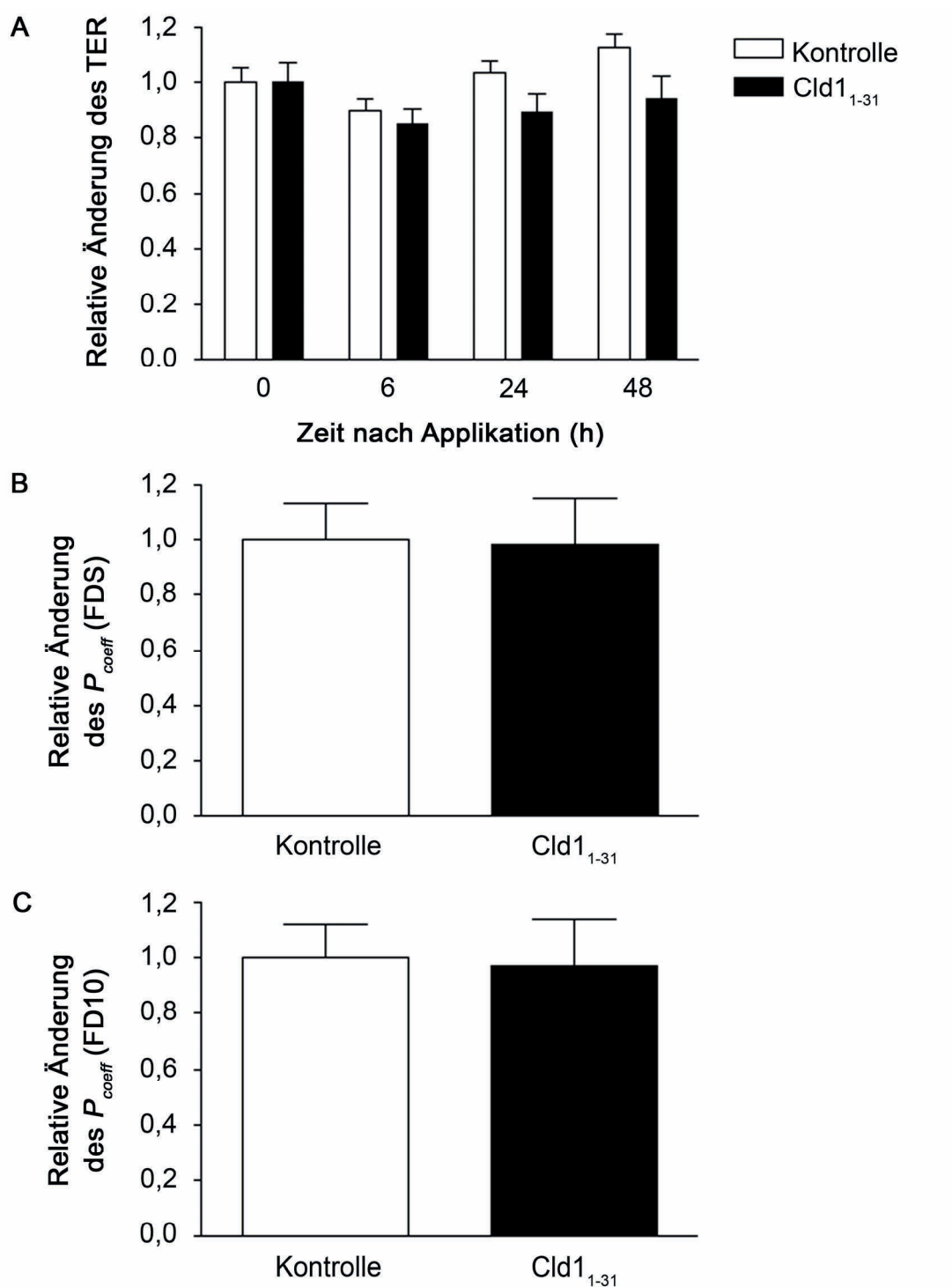
In weiteren Experimenten sollte die Wirkung von Cld1<sub>53-81</sub> auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco-2-Zellen mit der Wirkung von Peptiden verglichen werden, deren Effekt auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen bereits nachgewiesen wurde. Dafür wurde die Wirkung des GlyR-TDM-Peptids auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco-2-Zellen untersucht, dessen Sequenz bis auf vier zusätzliche Lysine am N-Terminus der 2. TMD des Glycinrezeptors entsprach [Reddy, 93]. Es wurde bereits beschrieben, dass GlyR-TDM die TJ von MDCK-II-Zellen öffnet [Reddy, 93]. Auch bei Caco-2-Zellen führte die beidseitige Behandlung mit 300  $\mu$ M GlyR-TDM zu einer im Vergleich zur Kontrolle signifikanten und fast vollständigen Reduktion des TER (Abbildung 42).



**Abbildung 42: GlyR-TMD reduziert den TER nach Behandlung von Caco-2-Zellen.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu$ M GlyR-TMD behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Die Behandlung mit GlyR-TMD (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zur signifikanten Reduktion des TER. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,0001$  gemäß Mann-Whitney-U-Test,  $n = 6$ .

### 3.2.2.6 Claudin-1<sub>1-31</sub>

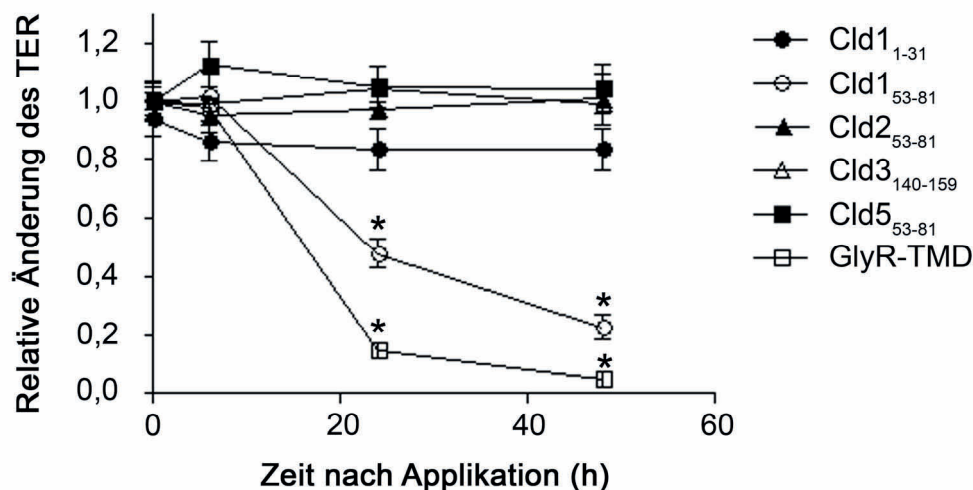
Ausgehend von dem Peptid GlyR-TMD wurde außerdem die Wirkung eines Peptids, dessen Sequenz der 1. TMD von Cld1 entsprach (Cld1<sub>1-31</sub>), auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco-2-Zellen untersucht. Die beidseitige Behandlung von Caco-2-Zellen mit 300  $\mu$ M Cld1<sub>1-31</sub> hatte weder eine Wirkung auf den TER noch auf die parazelluläre Permeation von FDS und FD10 (Abbildung 43).



**Abbildung 43: Cld1<sub>1-31</sub> hat keinen Einfluss auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco-2-Zellen.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300  $\mu\text{M}$  Cld1<sub>1-31</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen (**A**). Die Behandlung mit Cld5<sub>53-81</sub> (schwarze Säulen) führte im Vergleich zur Kontrolle (weiße Säulen) zu keiner signifikanten Änderung des TER (Mittelwert  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*). Die parazelluläre Permeation von FDS (**B**) und FD10 (**C**) wurde 48 h nach Behandlung der Zellen mit Cld5<sub>53-81</sub> gemessen und unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von der Kontrolle. Mittelwert  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test,  $n = 6$ .

### 3.2.2.7 Zusammenfassung

Die Wirkung der untersuchten Peptide auf den TER von Caco-2-Zellen ist in Abbildung 44 zusammengefasst. Von allen untersuchten Claudinpeptiden hatte nur Cld1<sub>53-81</sub> eine Wirkung auf den TER. Diese Wirkung entsprach 24 bzw. 48 h nach der Applikation 60 bzw. 81 % der Wirkung von GlyR-TDM. Damit war die Stärke der Wirkung von Cld1<sub>53-81</sub> auf den TER mit der Wirkstärke des GlyR-TDM vergleichbar.



**Abbildung 44: Zusammenfassung der Wirkung aller untersuchten Peptide auf den TER von Caco2-Zellen.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 300 µM Cld1<sub>1-31</sub>, Cld1<sub>53-81</sub>, Cld2<sub>53-81</sub>, Cld3<sub>140-159</sub>, Cld5<sub>53-81</sub> oder GlyR-TMD behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Cld1<sub>53-81</sub> und GlyR-TMD führten im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle zur signifikanten Reduktion des TER. Die übrigen Claudinpeptide veränderten den TER nicht signifikant. Mittelwert ± SEM, \*  $p < 0.0001$  im Vergleich zur Kontrolle gemäß Mann-Whitney-U-Test,  $n \geq 6$ .

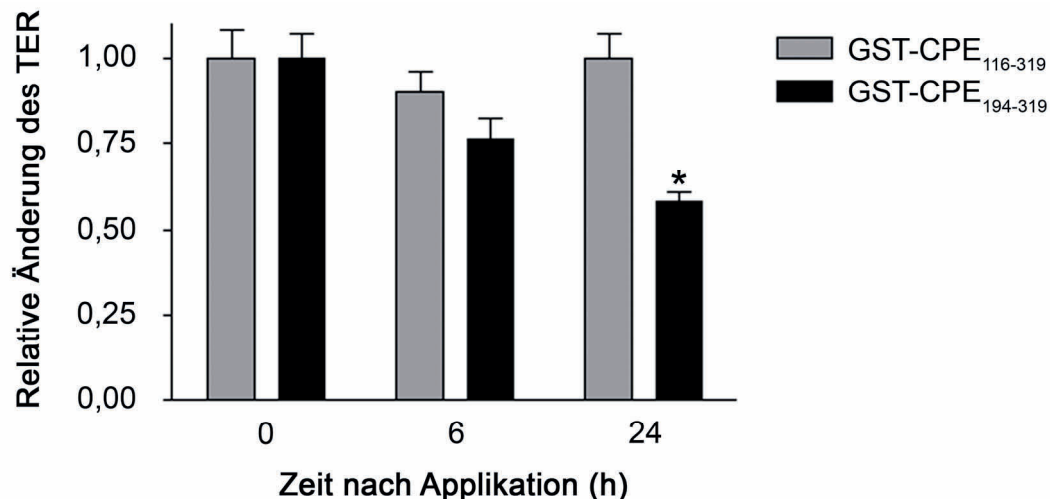
### 3.2.3 Wirkung von CPE-Peptiden auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen

Zur experimentellen Öffnung von Cld3- und/oder Cld4-haltigen TJ werden CPE-Deletionskonstrukte (C-CPE) verwendet, denen die Aminosäuren fehlen, die nach Bindung an Cld3/Cld4 Poren ausbilden und damit zur Lyse der Zellen führen (1.5.2). Im Rahmen von Rezeptorbindungsstudien (Promotion von Lars Winkler, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland) wurden zwei CPE-Deletionskonstrukte (GST-CPE<sub>116-319</sub> und GST-CPE<sub>194-319</sub>) mit hoher Affinität zur 2. EZS von Cld3 identifiziert. Daher sollte in dieser Arbeit die Wirkung von GST-CPE<sub>116-319</sub> und GST-CPE<sub>194-319</sub> auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco2-Zellen untersucht und eine mögliche Abhängigkeit ihrer Wirkung vom



Applikationsort ermittelt werden, da für zahlreiche C-CPE-Konstrukte bereits gezeigt wurde, dass nur die basolaterale Applikation wirksam ist.

Dafür wurden Caco-2-Zellen zunächst beidseitig mit 10 µg/µl GST-CPE<sub>116-319</sub> oder GST-CPE<sub>194-319</sub> behandelt. Während GST-CPE<sub>194-319</sub> nach 24 h im Vergleich zur Kontrolle zur signifikanten Reduktion des TER führte, hatte GST-CPE<sub>116-319</sub> keine signifikante Wirkung auf den TER der Caco-2-Zellen (Abbildung 45).



**Abbildung 45: Während GST-CPE<sub>194-319</sub> nach 24 h zur signifikanten Reduktion des TER führt, hat GST-CPE<sub>116-319</sub> im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Wirkung auf den TER.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* beidseitig mit 10 µg/µl GST-CPE<sub>116-319</sub> und GST-CPE<sub>194-319</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6 und 24 h danach gemessen. Mittelwert ± SEM, \*  $p < 0,0001$  gemäß Mann-Whitney-U-Test,  $n = 6$ .

Die im Vergleich zu GST-CPE<sub>116-319</sub> stärkere Reduktion des TER durch GST-CPE<sub>194-319</sub> wurde in einem zweiten Experiment bestätigt. In diesem Versuch wurden die Caco-2-Zellen zunächst bis zum Erreichen der Konfluenz auf Filtern kultiviert und anschließend die TJ durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug (2.4.7) geöffnet. Unmittelbar nach der erneuten Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  wurden die Zellen mit 10 µg/µl GST-CPE<sub>194-319</sub> oder GST-CPE<sub>116-319</sub> behandelt. GST-CPE<sub>194-319</sub> verhinderte die Reorganisation der TJ und den damit verbundenen Wiederaufbau des TER signifikant (Abbildung 46). Im Gegensatz dazu verzögerte GST-CPE<sub>116-319</sub> lediglich diese Prozesse, so dass sich der TER der mit diesem Peptid behandelten Zellen 8 h nach der  $\text{Ca}^{2+}$ -Resupplementierung nicht mehr signifikant vom TER der Kontrolle unterschied.

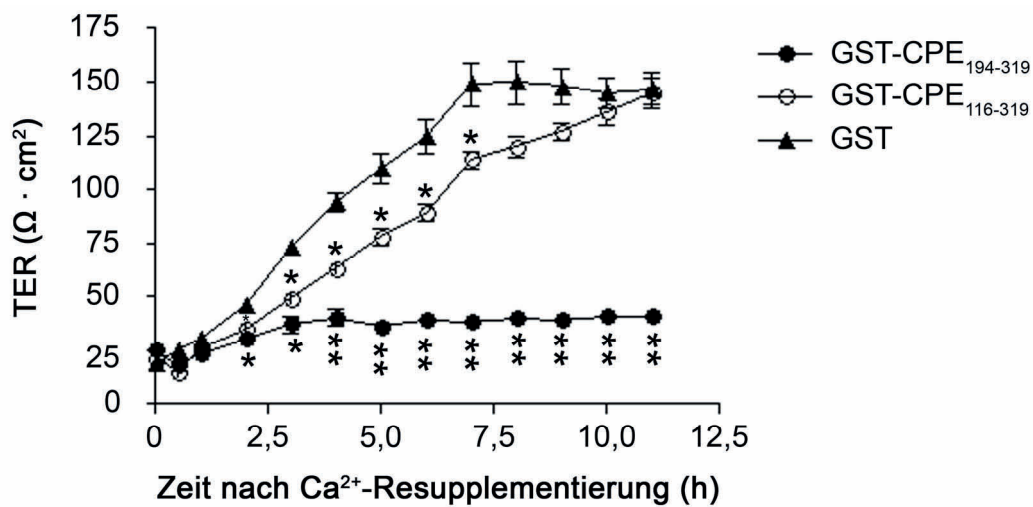
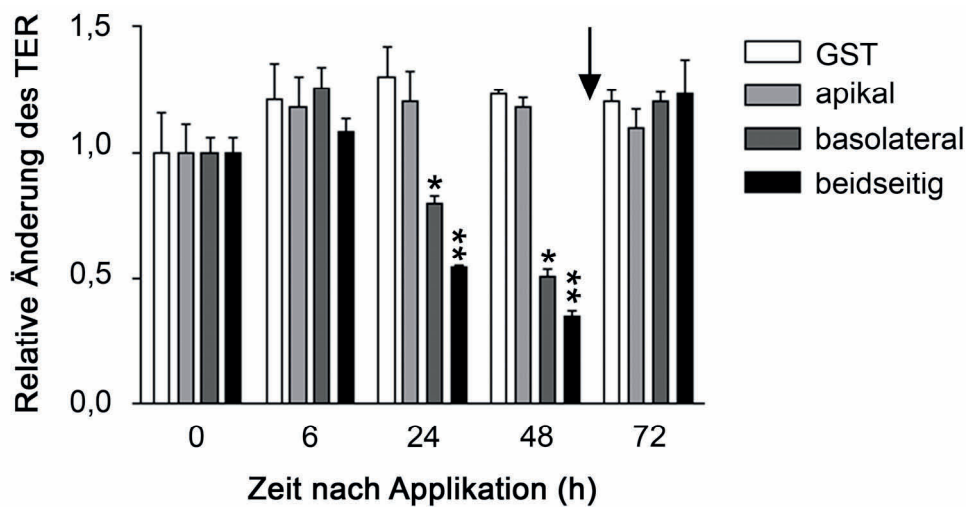


Abbildung 46: Bei Ca<sup>2+</sup>-Depletion und anschließender Ca<sup>2+</sup>-Resupplementierung verhindert nur GST-CPE<sub>194-319</sub> aber nicht GST-CPE<sub>116-319</sub> den Wiederaufbau des TER der Caco-2-Zellen signifikant. Caco-2-Zellen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz auf Zellkulturfiltern kultiviert. Anschließend wurde die TJ durch Kultivierung in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium geöffnet. Parallel zur Ca<sup>2+</sup>-Resupplementierung erfolgte die beidseitige Behandlung mit 10 µg/ml GST-CPE<sub>194-319</sub>, GST-CPE<sub>116-319</sub> oder GST. Mittelwert ± SEM, \* p < 0,01 und \*\* p < 0,001 im Vergleich zur GST-Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*, n = 6.

Um eine eventuelle Abhängigkeit der Wirkung von GST-CPE<sub>194-319</sub> vom Applikationsort zu identifizieren, wurden Caco-2-Zellen im nächsten Schritt apikal, basolateral oder beidseitig mit 10 µg/µl GST-CPE<sub>194-319</sub> behandelt. Die apikale Behandlung der Caco-2-Zellen mit CPE<sub>194-319</sub> führte im Vergleich zur GST-Kontrolle zu keiner signifikanten Änderung des TER (Abbildung 47). Bei basolateraler Applikation wurde jedoch bereits nach 24 h eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Reduktion des TER beobachtet, die auch 48 h nach der Applikation messbar war. In Übereinstimmung mit dem vorherigen Experiment führte auch beidseitig appliziertes GST-CPE<sub>194-319</sub> nach 24 bzw. 48 h zur signifikanten Reduktion des TER. Die Wirkung des CPE<sub>194-319</sub> war vollständig reversibel, da sich der TER 24 h nach dem Auswaschen des Peptids durch Mediumwechsel (Pfeil in Abbildung 47) nicht mehr signifikant vom TER der Kontrolle unterschied.



**Abbildung 47: Basolateral appliziertes GST-CPE<sub>194-319</sub> reduziert den TER von Caco-2-Zellen reversibel.** Die Zellen wurden auf Zellkulturfiltern ausgesät und nach Ausbildung eines konfluenten *Monolayers* apikal, basolateral oder beidseitig mit 10 µg/µl GST-CPE<sub>194-319</sub> behandelt. Der TER wurde vor der Behandlung sowie 6, 24 und 48 h danach gemessen. Die basolateral oder beidseitig behandelten Caco-2-Zellen wiesen 24 und 48 h nach der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle einen signifikant reduzierten TER auf. Die apikale Behandlung der Zellen hatte keine signifikante Wirkung auf den TER. Nach 48-stündiger Inkubation wurde GST-CPE<sub>194-319</sub> durch einen Mediumwechsel entfernt (Pfeil). Nach weiteren 24 h unterschied sich der TER der basolateral oder beidseitig behandelten Zellen nicht mehr signifikant von der Kontrolle. Mittelwert ± SEM, \*  $p < 0,01$  und \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur GST-Kontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n = 6$ .

Zusammenfassend wurde auch mit dem Peptid GST-CPE<sub>194-319</sub> beobachtet, dass seine Wirkung auf den TER vom Applikationsort abhängig ist. Dabei erweist sich die basolaterale Zelloberfläche gegenüber der Wirkung von GST-CPE<sub>194-319</sub> als anfälliger.



## 4 Diskussion

### 4.1 Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die Integrität von *tight junctions*

Den Ausgangspunkt für die Untersuchungen dieser Arbeit bildeten Studien zur subzellulären Lokalisation von Cld5-YFP- oder Cld5-CFP-Proteinen mit Substitutionsmutationen in der 2. EZS [Piontek, 08]. Diese Untersuchungen ergaben, dass der Austausch einzelner Aminosäuren in der 2. EZS von Cld5 zu Veränderungen der subzellulären Lokalisation von Cld5 in HEK-293-Zellen führt. Die Cld5-Mutanten wurden in drei verschiedene Phänotypen eingeteilt. Mutanten, die wie Cld5<sub>wt</sub> eine Anreicherung in den benachbarten Plasmamembranen transfizierter Zellen aufwiesen, wurden als TJ-Typ bezeichnet. In dieser Arbeit wurde Cld5<sub>R145A</sub> als Vertreter dieser Gruppe analysiert. Bei der zweiten Gruppe von Cld5-Mutanten blockierte die Mutation die homophile Cld5-*trans*-Interaktion und führte somit zum Verlust der Kontaktanreicherung in den benachbarten Plasmamembranen transfizierter Zellen. Als Vertreter dieser Gruppe (*disjunction*-Typ) wurden Cld5<sub>Y148A</sub> und Cld5<sub>E159Q</sub> analysiert. Bei der letzten Gruppe von Cld5-Mutanten führte der Austausch einer Aminosäure in der 2. EZS zur Retention des translatierten Claudinproteins im endoplasmatischen Retikulum und damit zum Verlust der Plasmamembranlokalisation. Als Vertreter dieser Gruppe (intrazellulärer Typ) wurde Cld5<sub>K157A</sub> analysiert. Es war allerdings nicht möglich, alle untersuchten Cld5-Mutanten eindeutig einer Gruppe zuzuordnen, da auch Mischformen beobachtet wurden. Beispielsweise wurde mit Cld5<sub>Y158A</sub> auch eine Cld5-Mutante eingeschlossen, die in HEK-293-Zellen zwar kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt war, aber auch eine intrazelluläre Anreicherung aufwies.

Nachdem die Bedeutung dieser Aminosäuren in der 2. EZS von Cld5 für dessen subzelluläre Lokalisation in HEK-293-Zellen durch [Piontek, 08] aufgeklärt wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit weiterführend die Bedeutung dieser Aminosäuren für die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen untersucht werden.

#### **4.1.1 Auswahl geeigneter Cld5-Proteine und einer geeigneten Zelllinie für Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit**

Die von [Piontek, 08] genutzten HEK-293-Zellen sind epithelialen Ursprungs, exprimieren jedoch keine Claudine und bilden keine TJ aus [Hou, 06; Amasheh, 05; Medina, 00; Balda, 96]. Mittels Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass die Expression von Claudinen in HEK-293-Zellen die Ausbildung von TJ-Strängen induziert [Turksen, 01; Piontek, 08]. Dennoch konnten von [Piontek, 08] hergestellte HEK-293-Zelllinien, die Cld5-YFP/CFP-Proteine stabil exprimierten, in dieser Arbeit nicht für Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit genutzt werden, da die ausgebildeten parazellulären Widerstände zu gering waren. Außerdem befand sich das YFP am C-Terminus der Cld5-Proteine, wodurch die ZO-1-Bindungsstelle blockiert wurde und das Fusionsproteins im Vergleich zum nativen Cld5 mehr als doppelt so groß war. Daher wurden in dieser Arbeit neue Cld5-Fusionsproteine hergestellt, die am N-Terminus ein nur acht Aminosäuren langes FLAG-Tag trugen (2.2.1, Abbildung 9).

Um den Einfluss der verschiedenen FLAG-Cld5-Proteine auf die parazelluläre Dichtigkeit sowohl in Richtung einer zunehmenden als auch einer abnehmenden Barriereeigenschaft analysieren zu können, sollte eine Zelllinie ausgewählt werden, die einen messbaren parazellulären Widerstand ausbildet. Bei der Suche nach einer geeigneten Zelllinie wurde zunächst der TER epithelialer und endothelialer Zelllinien analysiert. Dabei wiesen HEK-293-Zellen, die keine TJ ausbilden [Piontek, 08] aber auch hCMEC/D3, die endogene TJ ausbilden [Weksler, 05], keinen messbaren TER auf (Abbildung 11). Folglich wurden sie als Kandidatenzelllinien für parazelluläre Dichtigkeitsmessungen nicht weiter berücksichtigt. Die verbleibenden Zelllinien MDCK-I, MDCK-II, Caco-2 und NRC bildeten ausreichend hohe TER-Werte aus. Da sie außerdem endogene Claudine exprimieren, bilden sie den physiologischen Aufbau von TJ-Strängen, die in epithelialen und endothelialen Geweben fast ausschließlich mindestens zwei verschiedene Vertreter der Claudinfamilie enthalten, gut nach [Amasheh, 05; Furuse, 01; Sheth, 07; Morita, 99a; Rahner, 01]. Für MDCK-II-Zellen stimmten diese Befunde mit bereits publizierten Daten überein, die zeigen, dass MDCK-II-Zellen ausreichend hohe parazelluläre Widerstände ausbilden, die es gestatten, sowohl eine Reduktion als auch eine Erhöhung der parazellulären Dichtigkeit sicher zu bestimmen [Wen, 04; Kahle, 04].

Da in den anschließenden parazellulären Dichtigkeitsmessungen die Bedeutung einzelner Aminosäuren der 2. EZS von Cld5 für die TJ-Integrität untersucht werden sollte, indem die FLAG-Cld5-Proteine stabil in Epithelzellen transfiziert werden sollten, war eine möglichst hohe Transfektionseffizienz der Zelllinie erforderlich. Daher wurde im nächsten Schritt die Transfektionseffizienz der Zelllinien MDCK-I, MDCK-II, Caco-2 und NRC durch transiente Transfektionen des FLAG-Cld5<sub>wt</sub>-Konstrukts analysiert. Caco-2- und MDCK-I-Zellen wurden aufgrund ihrer niedrigen Transfektionseffizienzen nicht länger berücksichtigt. Ein weiteres Argument gegen die Verwendung von MDCK-I-Zellen für Untersuchungen zur Wirkung von FLAG-Cld5 auf die parazelluläre Dichtigkeit lieferten Experimente, in den gezeigt wurde, dass die exogene Expression von Cld5<sub>wt</sub> in diesen Zellen keinen Einfluss auf den TER hat [Amasheh, 05]. NRC und MDCK-II-Zellen wiesen ausreichende Transfektionseffizienzen auf. Für MDCK-II-Zellen wurde außerdem bereits beschrieben, dass die stabile Transfektion mit Cld5<sub>wt</sub> zur Erhöhung des TER führt [Wen, 04]. Für die NRC wurden bisher keine vergleichbaren Untersuchungen publiziert.

Um eine Zelllinie zu identifizieren, die neben einem ausreichend hohen TER auch endogene TJ ausbildet, aber kein endogenes Cld5 exprimiert, wurde im nächsten Schritt die Expression endogener TJ-Proteine einschließlich Cld5 in NRC und MDCK-II-Zellen mittels *Western Blot* untersucht. In beiden Zelllinien wurde eine adäquate Expression endogener TJ-Proteine beobachtet. Da NRC im Gegensatz zu MDCK-II-Zellen endogenes Cld5 exprimierten, wurden die MDCK-II-Zellen für die stabile Transfektion mit FLAG-Cld5-Konstrukten und die anschließenden parazellulären Dichtigkeitsmessungen ausgewählt. MDCK-II-Zellen ähneln Endothelzellen dahingehend, dass sie mehrere Vertreter der Claudin-Familie sowie Occludin und ZO-1 exprimieren und TJ-Stränge ausbilden [Hou, 06; Amasheh, 05; Medina, 00; McClane, 88].

#### **4.1.2 Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für dessen subzelluläre Lokalisation**

Um die subzellulären Lokalisationen der hergestellten FLAG-Cld5-Proteine mit denen der Cld5-YFP/CFP-Proteine von [Piontek, 08] zu vergleichen, wurden die FLAG-Cld5-Konstrukte zunächst ebenfalls in HEK-293-Zellen transfiziert. Gleichzeitig konnte damit die Lokalisation der neuen FLAG-Cld5-Proteine unabhängig von anderen Claudinen überprüft werden.

Von den fünf in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuresubstitutionen in der 2. EZS von Cld5 führte nur der Austausch von K durch A an der Position 157 zum Verlust der Lokalisation von Cld5 in den TJ und in der Plasmamembran. Damit verhielt sich das in dieser Arbeit untersuchte FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> wie das bereits beschriebene Cld5<sub>K157A</sub>-YFP, das in HEK-293-Zellen ebenfalls intrazellulär lokalisiert war [Piontek, 08]. Folglich war die intrazelluläre Lokalisation von Cld5<sub>K157A</sub> von der Expression weiterer endogener Claudine unabhängig. Für Cld5<sub>K157A</sub>-YFP wurde bereits eine Co-Lokalisation mit einem Marker für das endoplasmatische Retikulum gezeigt [Piontek, 08]. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Mutation K157A zur Fehlfaltung von Cld5 und damit zur Retention des Proteins im endoplasmatischen Retikulum führt. Es wurde bereits beschrieben, dass zwischen der Fehlfaltung von Proteinen und ihrer Retention im endoplasmatischen Retikulum ein direkter Zusammenhang besteht [Bross, 99]. Auch wurde bereits für einen andere Vertreter der Claudinfamilie (Cld16) gezeigt, dass der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der 2. EZS zum Verlust der Lokalisation in der Plasmamembran und damit zur intrazellulären Lokalisation des Proteins führt [Hou, 05; Kausalya, 06]. Zusammenfassend wird geschlussfolgert, dass der Verlust der Plasmamembranlokalisation von Cld5 durch die Mutation K157A in MDCK-II-Zellen, die endogenes Cld1, Cld2, Cld3 und Cld4 exprimieren, nicht aufgehoben wird. Aufgrund der intrazellulären Lokalisation von FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> konnte der direkte Einfluss dieser Aminosäuresubstitution auf die Lokalisation von Cld5 in den TJ und damit die Co-Lokalisation mit endogenem Cld1 und Occludin nicht bestimmt werden (3.1.5).

Die Aminosäuresubstitution R145A in der 2. EZS von Cld5 hatte weder in HEK-293-Zellen noch in MDCK-II-Zellen einen Einfluss auf dessen subzelluläre Lokalisation. Folglich war Cld5<sub>R145A</sub> in HEK-293-Zellen in der Plasmamembran benachbarter transfizierter Zellen angereichert und in MDCK-II-Zellen kontinuierlich über die Plasmamembran verteilt.

Die Aminosäuresubstitutionen Y148A, Y158A und E159A in der 2. EZS von Cld5-YFP/CFP führten in HEK-293-Zellen zum Verlust der Kontaktanreicherung von Cld5 in den Plasmamembranen benachbarter transfizierter Zellen und daher zur kontinuierlichen Verteilung der Cld5-Mutanten in der Plasmamembran. Cld5<sub>Y158A</sub> war außerdem verstärkt intrazellulär angereichert [Piontek, 08]. Die entsprechenden FLAG-Cld5-Mutanten wiesen in HEK-293-Zellen und in MDCK-II-Zellen dieselbe subzelluläre Lokalisation auf.



Zusammenfassend verhielten sich alle FLAG-Cld5-Proteine wie die ihnen entsprechenden Cld5-CFP/YFP-Proteine [Piontek, 08].

#### **4.1.3 Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für den transepithelialen elektrischen Widerstand**

Die Bedeutung ausgewählter Aminosäuren der 2. EZS von Cld5 für den TER von MDCK-II-Zellen wurde untersucht, indem MDCK-II-Zellen stabil mit FLAG-Cld5-Punktmutanten stabil transfiziert wurden und der TER dieser stabilen Linien mit dem TER von MDCK-II-Zellen verglichen wurde, die Cld5<sub>wt</sub> oder die Vektorkontrolle stabil exprimierten.

Die stabile Expression von Cld5<sub>wt</sub> in MDCK-II-Zellen führte zur Erhöhung des TER. Diese abdichtende Wirkung von exogen exprimiertem Cld5<sub>wt</sub> in MDCK-II-Zellen stimmt mit publizierten Daten überein [Wen, 04]. Auch in Caco-2- und RLE-Zellen führte die Transfektion von Cld5<sub>wt</sub> zur Erhöhung des TER [Amasheh, 05; Soma, 04]. In Übereinstimmung mit diesen Befunden führte der *knock-down* von Cld5 in der Gehirnendothelzelllinie bEND3 zur Reduktion des TER [Koto, 07]. Allerdings hatte die exogene Expression von Cld5<sub>wt</sub> in einer Lungenepithelzelllinie sowie in Mausfibroblasten keinen Einfluss auf den TER. Stattdessen wurde eine erhöhte parazelluläre Permeabilität gegenüber 10 - 2.000 kDa großen Molekülen beobachtet [Coyne, 03]. Bei der Bewertung dieses gegensätzlichen Befunds ist zu berücksichtigen, dass sowohl die verwendete Lungenepithelzelllinie als auch die Mausfibroblasten keine endogenen TJ ausbilden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich Cld5 in TJ-freien Zelllinien anders verhält als in MDCK-II-Zellen, die mehrere Mitglieder der Claudinfamilie exprimieren.

Die Bedeutung einzelner Aminosäuren in den extrazellulären Schleifen von Cld5 für die Erhöhung des parazellulären Widerstands durch dieses TJ-Protein wurde bisher nur für die 1. EZS untersucht. Dabei führte die stabile Transfektion der Mutanten Cld5<sub>Q44N</sub>, Cld5<sub>C54S</sub> und Cld5<sub>C64S</sub> sowie der Doppelmutanten Cld5<sub>C54S,C64S</sub> und Cld5<sub>L50Q,W51R</sub> in MDCK-II-Zellen im Vergleich zu den Cld5<sub>wt</sub>-exprimierenden Zellen zur signifikanten Reduktion des TER auf Werte, die sich nicht mehr signifikant von denen der Vektorkontrolle unterschieden [Wen, 04]. Die untersuchten nativen Aminosäuren in diesem Strukturbereich sind damit maßgeblich an der Erhöhung des parazellulären Widerstands durch Cld5 beteiligt.

Die Bedeutung einzelner Aminosäuren der 2. EZS von Cld5 für dessen Wirkung auf den TER war bisher nicht bekannt. Die hier durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass auch Aminosäuren der 2. EZS für die Erhöhung des TER durch Cld5 verantwortlich sind. Die MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>R145A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>, FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> bzw. FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> stabil exprimierten, wiesen TER-Werte auf, die sich nicht signifikant untereinander oder vom TER der Vektorkontrolle unterschieden. Folglich sind die nativen Aminosäuren Y148A, K157A, Y158A und E159Q von Cld5 für die Erhöhung des TER durch dieses Protein essentiell. Allerdings ist zu vermuten, dass sich die untersuchten Aminosäuren hinsichtlich des Mechanismus, mit dem sie zur Erhöhung des TER beitragen, unterscheiden.

Die Mutation Cld5<sub>K157A</sub> führte sowohl in HEK-293-Zellen [Piontek, 08] als auch in MDCK-II-Zellen (3.1.3.3) zur Retention des normalerweise plasmamembranständigen Cld5 im Zytoplasma. Folglich wurde die Cld5-Mutante nicht in die TJ-Stränge eingebaut und konnte nicht zur Erhöhung des TER durch die TJ beitragen.

Die beiden *disjunction*-Mutanten Cld5<sub>Y148A</sub> und Cld5<sub>E159Q</sub> sowie die intrazellulär-*disjunction*-Mutante Cld5<sub>Y158A</sub> waren in den TJ lokalisiert. Allerdings führten diese Mutationen in HEK-293-Zellen zur Störung der homophilen Cld5-*trans*-Interaktionen und damit zum Verlust der Kontakthanreicherung von Cld5 [Piontek, 08]. Der Einbau von Cld5-Mutanten, deren Fähigkeit zur *trans*-Interaktion blockiert ist, führt wahrscheinlich zur Ausbildung undichter TJ-Stränge. Auf diese Weise könnten Poren innerhalb der TJ entstehen. Dies wiederum könnte die parazelluläre Permeationen von Ionen aber auch von Molekülen erleichtern.

Die Mutante Cld5<sub>R145A</sub>-YFP führte in HEK-293-Zellen zwar nicht zum Verlust, aber im Vergleich zum Cld5<sub>wt</sub>-YFP zu einer leichten Reduktion der homophilen Cld5-*trans*-Interaktion [Piontek, 08]. Die Substitution von R durch A bedeutet den Austausch einer basischen, positiv geladenen Aminosäure gegen eine neutrale, ungeladene Aminosäure. Der Verlust der positiven Ladung führt möglicherweise direkt zum Verlust der abdichtenden Wirkung von Cld5 gegenüber Ionen, die zum TER beitragen. Diese Vermutung wird durch frühere Experimente an MDCK-II-Zellen unterstützt, in denen beobachtet wurde, dass Cld5<sub>wt</sub> die parazelluläre Permeation von Kationen verhindert [Wen, 04]. Daher ist es möglich, dass der Verlust einer positiven Ladung in der 2. EZS von Cld5 dessen Barrie-

reeigenschaften gegenüber Kationen abschwächt und damit die Erhöhung des TER verhindert.

Dass sich der TER der MDCK-II-Zellklone, die FLAG-Cld5-Mutanten stabil exprimierten, nicht signifikant vom TER der Vektorkontrolle unterschied, impliziert auch, dass die untersuchten Mutationen den TER nicht erhöhten. Dieser Befund stimmt mit Daten zu Mutationen in der 1. EZS von Cld5 überein. Auch die exogene Expression von Cld5-Proteinen mit Substitutionsmutationen in der 1. EZS führte lediglich zum Verlust der Erhöhung des TER durch Cld5<sub>wt</sub>, jedoch im Vergleich zur Vektorkontrolle nicht zu erhöhter Durchlässigkeit für Ionen, die zum TER beitragen [Wen, 04]. Eine mögliche Ursache könnte die endogene Expression von Cld2 in MDCK-II-Zellen darstellen. Cld2 bildet negativ geladene Poren aus und ermöglicht damit die parazelluläre Permeation von Kationen [Van Itallie, 03; Amasheh, 02; Van Itallie, 08; Fujita, 08]. Da Cld5 die parazelluläre Permeation von Kationen einschränkt, erfüllen Cld2 und Cld5 entgegengesetzte Funktionen. Die exogene Expression des porenbildenden Cld2 in MDCK-I/MDCK-C7-, Caco-2- oder LLC-PK1-Zellen führt zur signifikanten Reduktion des TER [Van Itallie, 03; Furuse, 01; Amasheh, 02; Van Itallie, 08; Fujita, 08]. Ferner ist Cld2 dafür verantwortlich, dass MDCK-I-Zellen im Vergleich zu MDCK-II-Zellen einen höheren TER aufweisen [Barker, 81; Valentich, 81; Stevenson, 88]. Zwar unterscheiden sich beide Zelllinien nicht hinsichtlich der Anzahl der TJ-Stränge, jedoch wird Cld2 in MDCK-II-Zellen stärker exprimiert als in MDCK-I-Zellen [Stevenson, 88; Amasheh, 05]. Daher ist anzunehmen, dass der TER in untransfizierten bzw. mit der Vektorkontrolle transfizierten MDCK-II-Zellen maßgeblich von Cld2 bestimmt wird. Aufgrund der starken Expression des porenbildenden Cld2 in MDCK-II-Zellen könnte deren *baseline* Permeabilität gegenüber Ionen so hoch sein, dass die exogene Expression von Cld5-Mutanten den TER nicht weiter abschwächt [Furuse, 01]. Diese Vermutung wird durch Experimente gestützt, in denen Cld2 in MDCK-II-Zellen überexprimiert wurde. Der TER dieser Zellen blieb trotz erhöhter Cld2-Expression unverändert [Van Itallie, 03]. Da selbst die Überexpression des porenbildenden Cld2 den TER der MDCK-II-Zellen nicht reduzierte, ist ein unveränderter TER nach Expression der untersuchten FLAG-Cld5-Mutanten nicht überraschend.

#### **4.1.4 Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die parazelluläre Abdichtung gegenüber kleinen Molekülen**

Um die Bedeutung von R145, Y148, K157, Y158 und E159 von Cld5 für die Abdichtung gegen die parazelluläre Permeation kleiner Moleküle zu untersuchen, wurden die Permeationskoeffizienten für das 376 kDa große FDS in den stabil mit FLAG-Cld5 transfizierten MDCK-II-Zellen bestimmt (3.1.6.2).

MDCK-II-Zellen, die stabil mit FLAG-Cld5<sub>wt</sub> transfiziert wurden, wiesen im Vergleich zur Vektorkontrolle eine signifikant höhere Dichtigkeit gegenüber FDS auf. Diese abdichtende Wirkung von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> gegenüber kleinen Molekülen passt zu Befunden in Cld5-*knock out*-Mäusen. Die parazelluläre Permeabilität der BHS dieser Tiere für Moleküle < 800 Da war im Vergleich zu Wildtyptieren erhöht [Nitta, 03]. Zudem führte die hypoxiebedingte Reduktion der Cld5-Expression in bEND3-Zellen zur erhöhten parazellulären Permeation des 534 Da großen Farbstoffs Hoechst H33258 [Koto, 07]. Demnach ist Cld5 in einer claudinheterogenen Umgebung vor allem für die parazelluläre Abdichtung gegenüber kleinen Molekülen verantwortlich, wohingegen die übrigen Claudine die parazelluläre Permeation größerer Moleküle einschränken. In einer weiteren Studie wurde beschrieben, dass die Transfektion von Cld5<sub>wt</sub> in MDCK-II-Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle zu einer etwa 40-prozentigen Reduktion der parazellulären Permeation von Mannitol (182 Da) führte [Wen, 04]. Allerdings war diese Reduktion aufgrund der hohen Standardabweichungen innerhalb einer Gruppe und aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten nicht statistisch signifikant.

Im Gegensatz zum FLAG-Cld5<sub>wt</sub> wiesen alle MDCK-II-Zellklone, die mutierte FLAG-Cld5-Proteine exprimierten, keine erhöhte parazelluläre Dichtigkeit gegenüber FDS auf. Folglich sind die nativen Aminosäuren Y148A, K157A, Y158A und E159Q von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> für dessen abdichtende Wirkung gegenüber kleinen Molekülen essentiell. Darüber hinaus führten die untersuchten Mutationen in der 2. EZS von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> nicht nur zum Verlust der abdichtenden Wirkung von FLAG-Cld<sub>wt</sub>, sondern sogar zur erhöhten parazellulären Permeation von FDS im Vergleich zur Vektorkontrolle. Obwohl alle untersuchten Substitutionsmutationen die gleiche Wirkung aufwiesen, ist wiederum zu vermuten, dass sich die untersuchten Aminosäuren hinsichtlich des Mechanismus, mit dem sie zum Aufbau der Barriereeigenschaft von Cld5<sub>wt</sub> gegenüber kleinen Molekülen beitragen, unterscheiden.

Für die *disjunction*-Mutanten FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> und FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> lässt sich der Verlust der abdichtenden Wirkung von Cld5 gegenüber FDS erneut mit dem Verlust der Cld5-Kontaktanreicherung erklären.

Bei den FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellklonen stellte sich die Frage, inwieweit eine intrazellulär lokalisierte Cld5-Mutante trotz Abwesenheit in den TJ die parazelluläre Permeation von FDS erhöhen kann. Eine Erklärungsmöglichkeit bieten die Interaktionen dieser Mutante mit anderen, im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Claudinen von MDCK-II-Zellen. Messungen des FRET zwischen Cld5<sub>K157A</sub>-YFP und Cld5<sub>K157A</sub>-CFP ergaben, dass die homophile *cis*-Interaktion zwischen diesen Proteinen trotz der Mutation nicht gestört war (persönliche Kommunikation mit Dr. Jörg Piontek, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Deutschland). Damit ist denkbar, dass auch Interaktionen von FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> mit seinen heterophilen Claudininteraktionspartnern nicht beeinträchtigt sind. Daher wäre es möglich, dass die heterophilen Claudininteraktionspartner von FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> aufgrund dieser Interaktion im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten werden. Folglich könnte in MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> stabil exprimieren, nicht nur das exogene FLAG-Cld5 in der Plasmamembran fehlen, sondern auch die Konzentration endogener Claudine, die normalerweise in den TJ lokalisiert sind, reduziert sein. Allerdings wurde kein Claudin gefunden, das in den FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen im Vergleich zu den übrigen FLAG-Cld5-exprimierenden MDCK-II-Zellen eine veränderte subzelluläre Lokalisation aufwies. Ebenso war die Expression und subzelluläre Lokalisation der TJ-Proteine Occludin und ZO-1 in FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle bzw. zum Cld5<sub>wt</sub> unverändert (Abbildung 19, 25). Im Gegensatz dazu war das transmembranale TJ-Protein JAM-1, das in FLAG-Cld5<sub>wt</sub>- bzw. FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>-exprimierenden Zellen in der Plasmamembran lokalisiert ist, in FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen nicht in der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 26). Die erhöhte parazelluläre Permeation von FDS in diesen Zellklonen könnte auf die veränderte subzelluläre Lokalisation von JAM-1 zurückzuführen sein, da bereits beschrieben wurde, dass JAM-1 die parazelluläre Dichtigkeit beeinflusst. Die Behandlung von T84-Zellen mit einem anti-JAM-Antikörper führte nach einem *calcium switch* assay zur signifikanten Reduktion TER [Liu, 00; Mandell, 04]. Ebenso führte die Transfektion von SK-CO15-Zellen mit JAM-1 siRNA sowohl zur Reduktion des TER als auch zur Erhöhung der parazellulären Permeation von 4 kDa FITC-Dextran [Laukoetter, 07].

Allerdings wurden bisher noch keine Interaktionen zwischen JAM-1 und Claudinen beschrieben.

#### **4.1.5 Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die parazelluläre Abdichtung gegenüber großen Molekülen**

Der in dieser Arbeit ermittelte  $P_{coeff}$  (FD10) von MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub> stabil exprimierten, unterschied sich nicht signifikant vom  $P_{coeff}$  (FD10) der Vektorkontrolle. Dieses Ergebnis stimmt mit Befunden aus Cld5-*knock out*-Mäusen überein. Diese Tiere unterschieden sich hinsichtlich der parazellulären Dichtigkeit der BHS gegenüber Tetramethylrhodamin-Dextran (10 kDa) nicht signifikant von Wildtypmäusen [Nitta, 03]. Folglich war die Dichtigkeit der BHS der untersuchten *knock out*-Mäuse gegenüber Molekülen in der Größenordnung von 10 kDa von der Expression von Cld5 unabhängig. In Übereinstimmung mit diesem Befund führte eine hypoxiebedingte geringere Expression von Cld5 in bEND3-Zellen nicht zur erhöhten Durchlässigkeit für 10 kDa Dextran [Koto, 07]. MDCK-II-Zellen weisen einen heterogenen Claudinhintergrund auf. Sie exprimieren die Claudine 1, 2, 3 und 4, die die parazelluläre Permeation von 10 kDa großen Molekülen unabhängig von Cld5 einschränken. Beispielsweise führte die Expression von exogenem Cld1 in claudinfreien Fibroblasten zur Abnahme der parazellulären Permeation von FD10 [Coyne, 03]. In Abwesenheit einer claudinheterogenen Umgebung führt die Expression von Cld5 ebenfalls zur parazellulären Abdichtung gegenüber größeren Molekülen. Beispielsweise reduzierte die Überexpression von Cld5 in HUVEC-Zellen nicht nur die parazelluläre Permeation von 342 kDa großen Molekülen, sondern auch die parazelluläre Permeation von Molekülen in der Größenordnung von 5 kDa und 40 kDa [Fontijn, 06]. Auch bei der Gehirndothelzelllinie TR-BBB, die endogen kein Cld5 exprimiert, führte die Expression von exogenem Cld5 zur Abdichtung gegenüber 5 kDa großen Molekülen [Ohtsuki, 07]. Die im Vergleich zu dieser Arbeit und zu den Ergebnissen von [Nitta, 03] zusätzlich beschriebene Abdichtung gegenüber 5 kDa und 40 kDa Dextran ist vermutlich auf das Fehlen weiterer abdichtender Claudine in HUVEC- und TR-BBB-Zellen zurückzuführen.

Im Gegensatz zu FLAG-Cld5<sub>wt</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen wiesen alle MDCK-II-Zellklone, die mutierte Cld5-Proteine exprimierten, die dem Phänotyp der *disjunction*-Mutante zugeordnet werden (Cld5<sub>Y148A</sub>, Cld5<sub>Y158Y</sub> und Cld5<sub>E159Q</sub>) im Vergleich zur Vektor-

kontrolle eine signifikant geringere parazelluläre Dichtigkeit gegenüber FD10 auf. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass der Einbau von Cld5-Mutanten ohne *trans*-Interaktionsfähigkeit zu relevanten Störungen innerhalb der TJ-Stränge führt. Diese Vermutung wird durch Versuche mit L-Fibroblasten gestützt, in denen beobachtet wurde, dass die Expression von Claudinen in benachbarten Zellen, zwischen denen keine heterophilen Claudininteraktionen erfolgen, zur Ausbildung undichter TJ führt [Furuse, 99]. Es ist davon auszugehen, dass die Cld5-*disjunction*-Mutanten neben dem Verlust der homophilen Cld5-*cis*-Interaktion auch keine heterophilen Cld-*cis*-Interaktionen mehr eingehen können. Daraus resultieren wiederum undichte TJ-Stränge.

Im Gegensatz zur parazellulären Permeation von FDS hatten nicht alle untersuchten Cld5-Mutationen einen Einfluss auf die Permeation von FD10. Die intrazelluläre FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>-Mutante sowie die Mutante vom TJ-Typ FLAG-Cld5<sub>R145A</sub> wiesen zwar im Vergleich zur Vektorkontrolle höhere Permeationskoeffizienten auf, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Basierend auf der Annahme, dass FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> im endoplasmatischen Retikulum heterophile *cis*-Interaktion eingehen kann, wird vermutet, dass FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> mit Claudinen interagieren kann, die den parazellulären Spalt gegenüber kleinen Molekülen abdichten, allerdings nicht mit Claudinen, die gegenüber größeren Molekülen abdichten. Auf diese Weise könnten Claudine, die den parazellulären Spalt gegenüber größeren Molekülen abdichten, ungehindert zur Plasmamembran transportiert werden und dem Einbau in die TJ-Stränge zur Verfügung stehen. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der subzellulären Lokalisation der untersuchten Claudine gefunden, die diese Annahme unterstützen würden. Stattdessen zeigte JAM-1 in FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen einen fast vollständigen Verlust der TJ-Lokalisation. Eine durch JAM-1 vermittelte Abdichtung des parazellulären Spalts wurden gegenwärtig noch nicht geschrieben. Daher könnte der Verlust der TJ-Lokalisation von JAM-1 auf die parazelluläre Permeation von großen Molekülen keinen Einfluss haben.

Die Substitution von R durch A in Position 145 des FLAG-Cld5 scheint die Integrität der TJ-Stränge weniger zu stören als FLAG-Cld5-Substitutionsmutationen vom *disjunction*-Typ. Dieser Befund könnte darauf zurückzuführen sein, dass FLAG-Cld<sub>R145A</sub> im Gegensatz zu *disjunction*-Mutanten die *trans*-Interaktionsfähigkeit nicht blockiert. Folglich sollten MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>R145A</sub> stabil exprimieren, dichtere TJ-Stränge ausbilden als MDCK-II-Zellen, die mit FLAG-Cld5-*disjunction*-Mutanten transfiziert wurden.

#### 4.1.6 Zusammenfassung der Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen des TER und der parazellulären Permeation von FDS und FD10 in MDCK-II-Zellen, die den Wildtyp oder verschiedene Mutanten der 2. EZS von FLAG-Cld5 stabil exprimierten, dass ein erhöhter TER nicht zwangsläufig auch eine höhere parazelluläre Dichtigkeit gegenüber größeren Molekülen bedingt (Tabelle 21). Ebenso kann der TER unverändert bleiben, obwohl die parazelluläre Dichtigkeit gegenüber größeren Molekülen niedriger ist. Diese intuitiv widersprüchlichen Beziehungen zwischen dem TER und der parazellulären Dichtigkeit gegenüber kleinen und größeren Molekülen wurden bereits für verschiedene exogen exprimierte Claudine publiziert. Beispielsweise führte die Expression von exogenem Cld1 in MDCK-II-T23-Zellen zur Erhöhung des TER und gleichzeitig zur Erhöhung der parazellulären Permeation von Mannitol [McCarthy, 00; Barth, 97]. Ein weiteres Beispiel liefert die exogene Expression von Occludin in MDCK-II-Zellen, die zur Erhöhung des TER führte, ohne die parazelluläre Permeation von Mannitol zu beeinflussen. Umgekehrt führte die Expression verschiedener Deletionsmutanten von Occludin zu einer erhöhten Permeation von Mannitol, ohne jedoch den TER zu beeinflussen [Balda, 00]. Die Überexpression von Cld4 in MDCK-II-Zellen führte zu einem signifikant höheren TER, jedoch blieb die parazelluläre Permeation von Mannitol unverändert [Van Itallie, 01].

Zusammenfassend hatten alle untersuchten Substitutionsmutationen in der 2. EZS von FLAG-Cld5 unterschiedliche Wirkungen auf die parazelluläre Dichtigkeit von MDCK-II-Zellen.

**Tabelle 21: Zusammenfassung der Wirkungen der stabil exprimierten FLAG-Cld5-Proteine auf die parazelluläre Dichtigkeit von MDCK-II-Zellen**

	R145A	R148A	K157A	Y158A	E159Q
<b>TER</b>					
• vs. wt	↓	↓	↓	↓	↓
• vs. Vektorkontrolle	↔	↔	↔	↔	↔
<b>FDS</b>					



• vs. wt	↑	↑	↑	↑	↑
• vs. Vektorkontrolle	↑	↑	↑	↑	↑
<b>FD10</b>					
• vs. wt	↔	↑	↔	↑	↑
• vs. Vektorkontrolle	↔	↑	↔	↑	↑

Da die Aminosäuresequenzen der 2. EZS zwischen den Mitgliedern der Claudinfamilie zum Teil hochkonserviert sind (Abbildung 48), könnte die 2. EZS der anderen Claudine ebenfalls für die parazelluläre Dichtigkeit bedeutsam sein. Beispielsweise besitzen Cld1 - Cld5, Cld8, Cld11, Cld17 und Cld22 an der Position 145 ein R. Außerdem weisen Cld1 - Cld9, Cld14 und Cld17 an der Position 148 ein Y auf. Cld2 - Cld10 sowie Cld13 - Cld17 (d. h. alle klassischen Claudine mit Ausnahme von Cld1 und Cld19) enthalten an der Position 157 ein K. Cld1, Cld5, Cld7, Cld10 und Cld18 besitzen an der Position 158 ein Y. An der Position 159 befindet sich bei Cld1-Cld10, Cld14, Cld15, Cld17, Cld20 - Cld22 (d. h. bei allen klassischen Claudinen) ein E. Folglich enthalten viele weitere Claudine an den Positionen 145, 148, 157, 158 und 159 die gleichen Aminosäuren wie das in dieser Arbeit untersuchte Cld5.

		2. EZS	
klassische Claudine		150	.....160
Nr. AS von Claudin-1			
Claudin-1	WYGNRIVQE	FYDPLTPINA	RYEFCQ
Claudin-2	WNLHGILRD	FYSPLVPDSM	KFEIGE
Claudin-3	W SANTIIRD	FYNPLVPEAQ	KREMGA
Claudin-4	WTAHNVIRD	FYNPMVASQ	KREMGA
Claudin-5	WFANIVVRE	FYDPTVPVSQ	KYELGA
Claudin-6	WTAHSIIQD	FYNPLVADAQ	KRELGA
Claudin-7	WIGHQIVTD	FYNPLTPMNV	KYEFQP
Claudin-8	WVANSIIRD	FYNPLVDVAL	KRELGE
Claudin-9	WTAHAIQD	FYNPLVAEAL	KRELGA
Claudin-10a	LYANKITTE	FFDPLYMEQ	KYELGA
Claudin-10b	LYANKITTE	FFDPLYMEQ	KYELGA
Claudin-14	WTTNDVVQN	FYNPLLPSCM	KFEICQ
Claudin-15	WYAVNITTD	FFNPLYAGT	KYELGP
Claudin-17	WTANIIIRD	FYDPTVHAQ	KRELGG
Claudin-19	WYATLVTQE	FFNPSTPVNA	RYEFCP
Konsensus klassisch	w a i d	Fy P	k E G
nicht-klassische Claudine			
Claudin-11	WFPVCAHREITIVSF		CY
Claudin-12	WAIFYNSHLNRKFEPVFT		FDYAV
Claudin-13	WVTHNIIHGFFNPLLGFSK		KVQMG
Claudin-16	WYAVDVYVERSSLVLHNIF		LGIQYKFCW
Claudin-18 A1.1	VFANMLVTNFWMSTANMYSGMGCMGMVQT	VQTRYTFGA	
Claudin-18 A2.1	VFANMLVTNFWMSTANMYSGMGCMGMVQT	VQTRYTFGA	
Claudin-20	WYTKEIIANFLDLTVPESN		KHEPCG
Claudin-21	WVAHKTVEFWDENVPDFV		PRWFCG
Claudin-22	WVAHKTVEFWDETPEIV		PRWFCG
Claudin-23	WYNHFLSDPDVLAAPSSPV		TVQVSY
Claudin-23	WYNHFLSDPDVLSAPSSPV		TVQVSY
Claudin-24	WVAHATIQDFWDDSIPOII		PRWFCG
Konsensus nicht-klass.	w		g
Konsensus alle	w	f	e g

**Abbildung 48: Vergleich der Aminosäuresequenz der 2. EZS der Mitglieder der Claudinfamilie.** Die Claudine wurden anhand von Sequenzähnlichkeiten in klassische und nicht-klassische Claudine eingeteilt. Angegeben sind die murinen Claudinsequenzen mit Ausnahme von Cld20, Cld21 und Cld24, von denen nur die humane Sequenz bekannt ist. Die beiden Isoformen von Cld10 und Cld18 unterscheiden sich nur hinsichtlich der Sequenz der 1. EZS. Für Cld23 sind zwei Sequenzen bekannt. Wiesen > 90 % bzw. > 70 % der Claudine an einer Position die gleiche AS auf, wurde die Konsensussequenz in großen bzw. kleinen Buchstaben angegeben (grün: hydrophobe Seitenkette, violett: hydrophile Seitenkette, blau: basische Seitenkette, magenta: saure Seitenkette, gelb: C, türkis: Y, schwarz: P (modifiziert nach [Krause, 08]).

#### **4.1.7 Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 für die Morphologie der *tight junction*-Stränge**

Obwohl sich MDCK-II-Zellen, die mit verschiedenen FLAG-Cld5-Konstrukten stabil transfiziert wurden, hinsichtlich ihrer parazellulären Dichtigkeit unterschieden, wurden mittels Gefrierbruchelektronenmikroskopie keine Unterschiede in der TJ-Morphologie gefunden. Sowohl die Anzahl der TJ-Stränge als auch deren Länge und Quervernetzung war vergleichbar. Dieser Befund stimmt mit publizierten Daten aus MDCK-I- und MDCK-II-Zellen. Obwohl sich der TER beider Zelllinien je nach Versuchsbedingungen um den Faktor 30 - 60 unterschied, waren die Anzahl und Komplexität der ausgebildeten TJ-Stränge vergleichbar [Stevenson, 88]. Andere Untersuchungen ergaben, dass die exogene Expression von Cld2 bzw. einem chimärem Cld2, dessen extrazelluläre Schleifen durch die extrazellulären Schleifen von Cld4 ersetzt wurden, die parazelluläre Dichtigkeit von MDCK-II-Zellen beeinflusste, obwohl die Morphologie der ausgebildeten TJ-Stränge vergleichbar war [Colegio, 03]. Folglich bedingen unterschiedliche parazelluläre Dichtigkeiten nicht zwangsläufig eine unterschiedliche Morphologie der TJ-Stränge.

Außerdem unterschied sich die Morphologie der TJ-Stränge der MDCK-II-Zellen, die verschiedene FLAG-Cld5-Proteine exprimierten, nicht von der Morphologie der TJ-Stränge der MDCK-II-Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert waren. Dieser Befund steht mit der Beobachtung im Widerspruch, dass die Überexpression von Cld4 in MDCK-II-Zellen zur Erhöhung der Anzahl und Komplexität der TJ-Stränge führt [Van Itallie, 01]. Folglich ist anzunehmen, dass Cld4 in einer claudinheterogenen Umgebung einen größeren Einfluss auf die Morphologie der TJ-Stränge hat als Cld5.

## **4.2 *Tight junction*-modulierende Substanzen**

Die gezielte therapeutische Öffnung von TJ, insbesondere in der BHS, stellt einen attraktiven Ansatz dar, um beispielsweise die Verfügbarkeit potentiell wirksamer Zytostatika, die die BHS nicht überwinden können, im Gehirn zu erhöhen. Diese Strategie ist im Vergleich zur Beeinflussung von Transportern, die in Endothelzellen exprimiert werden, effizienter und für eine größere Zahl strukturell verschiedener potentieller Wirkstoffe anwendbar. Daher bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, Substanzen zu charakterisieren, die die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen reduzieren.

#### 4.2.1 Claudinpeptide

In dieser Arbeit wurde zunächst die Wirkung verschiedener Claudinpeptide auf die parazelluläre Dichtigkeit von Caco-2- und MDCK-II-Zellen untersucht. Von allen untersuchten Claudinpeptiden führte nur das Peptid Cld1<sub>53-81</sub>, dessen Sequenz mit wenigen Ausnahmen der C-terminalen Hälfte der 1. EZS von Cld1 entsprach, zur signifikanten Reduktion des TER und zur Erhöhung der parazellulären Permeation von Caco-2- und MDCK-II-Zellen gegenüber FDS und FD10 (3.2.2.1). Damit wurde an verschiedenen Epithelzelllinien nachgewiesen, dass Cld1<sub>53-81</sub> die parazelluläre Dichtigkeit erhöht. Diese Wirkung von Cld1<sub>53-81</sub> war reversibel, da sich der TER der behandelten Caco-2- und MDCK-II-Zellen 48 h nach dem Auswaschen von Cld1<sub>53-81</sub> durch einen Mediumwechsel nicht mehr signifikant vom TER der unbehandelten Zellen unterschied.

Diese Daten stimmten mit den bereits beschriebenen Wirkungen eines ähnlichen Cld1-Peptids (Cld1<sub>53-80</sub>) überein, das sich von Cld1<sub>53-81</sub> nur darin unterschied, dass es am C-Terminus eine Aminosäure weniger umfasste und die Aminosäure C54 nicht gegen S ausgetauscht wurde [Mrsny, 08]; Tabelle 18). Cld1<sub>53-80</sub> führte in vergleichbaren Experimenten 12 h nach Applikation zur signifikanten Abnahme des TER von T84-Zellen [Mrsny, 08]. Im Gegensatz dazu wiesen Cld1<sub>31-53</sub> sowie Cld1<sub>146-160</sub>, deren Sequenzen anderen Abschnitten der 1. EZS von Cld1 entsprachen, keine Wirkung auf die parazelluläre Dichtigkeit der T84-Zellen auf. Daraus wurde abgeleitet, dass die Wirksamkeit dieser Peptide nicht daran gebunden war, dass ihre Sequenz Abschnitten der 1. EZS von Cld1 entsprach. Stattdessen wurde vermutet, dass die Wirksamkeit dieser Peptide auf bestimmte Aminosäuresequenzen aus der 1. EZS von Cld1 zurückzuführen war, die nur in Cld1<sub>53-80</sub> enthalten waren. Schließlich wurde ermittelt, dass die Sequenzen IQCKVF (Aminosäuren 62 - 67 von Cld1) und SLLNLNLSTL (Aminosäuren 69 - 77 von Cld1) für die Wirkung von Cld1<sub>53-80</sub> auf die parazelluläre Dichtigkeit der T84-Zellen essentiell waren [Mrsny, 08].

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Mitglieder der murinen Claudinfamilie verdeutlicht, dass nur Cld1 die Motive IQCKVF und SLLNLNLSTL enthält, die von [Mrsny, 08] für die Wirkung des Cld1<sub>53-80</sub> auf den TER der Epithelzellen als essentiell identifiziert wurde (Abbildung 49). Beispielsweise entspricht die Sequenz der Peptide Cld2<sub>53-81</sub> und Cld5<sub>53-81</sub> im Bereich dieser Motive der Sequenz von Cld1 nur zu 33 % bzw. 47 %. Dem

entspricht der Befund dieser Arbeit, dass die Wirkungen des Peptids Cld1<sub>53-81</sub> auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen nicht mit Peptiden reproduziert wurden, deren Sequenz der 1. EZS anderer Claudine entspricht. Weder Cld2<sub>53-81</sub> noch Cld5<sub>53-81</sub> führten zur signifikanten Reduktion des TER oder einem Anstieg der parazellulären Permeation von FDS oder FD10 (3.2.2.2 - 3).

C-Terminus 1. EZS	
Nr. AS von Claudin-1	6.0 7.0 . 80
Claudin-1	SCV SQST . CQIQCKVFDS . LLN . LNST LQATR
Claudin-2	ECATHST . GITQCDIYST . LLG . LPADIQAAC
Claudin-3	NCVVQST . GQMCKMYDS . LLA . LPQDLQAAR
Claudin-4	NCVVQST . GQMCKMYDS . MLA . LPQDLQAAR
Claudin-5	SCVVQST . GHMQCKVYES . VLA . LSAEVQAAR
Claudin-6	SCVVQST . GQMCKVYDS . LLA . LPQDLQAAR
Claudin-7	ECVTQST . GMMCKMYDS . VLA . LPGA LQATR
Claudin-8	NCMRHAN . IRMQCKVYDS . LLA . LSPDLQASR
Claudin-9	SCVVQST . GQMCKVYDS . LLA . LPQDLQAAR
Claudin-10a	NCAGNAL . GSFHCRPHFT . IFK . VEGYIQAAC
Claudin-10b	ICVTDST . GVANCKEFP . MLA . LDGYIQAAC
Claudin-14	ECVHST . GIYQCQIYRS . LLA . LPRDLQAAR
Claudin-15	SCATDSL . GVSNCWDFPS . MLA . LSGYVQCCR
Claudin-17	NCIQQAM . VTLQCKFYNS . ILA . LPPVLEAAR
Claudin-19	SCASQST . CQVQCKLYDS . LLA . LDGHIQSAR
Konsensus klassisch	C st g qCk y s La L Qa R
Claudin-11	DCVMAT . GLYHCKPLVD . ILI . LPGYVQAAC
Claudin-12	KCARYD . GSSDCLMYDR . TWY . LSVQDLDLR
Claudin-13	ICQVREN . RWIQCTLYDT . RIL . VAQDIKVS
Claudin-16	ECVTNAFDGIRTCDEYDS . IYAEHPLKLVVTR
Claudin-18 A1.1	SCVQQSS . GFTECRPYFT . ILG . LPAMLQAVR
Claudin-18 A2.1	SCVRESS . GFTECRGYFT . LLG . LPAMLQAVR
Claudin-20	DCTWYST . GMFSCALKHS . ILS . LPIHVQAAR
Claudin-21	TCVIQEE . VGMQCKDFDS . FLA . LPAELRVSR
Claudin-22	TCVIQEE . VGMQCKDFDS . FLA . LPAELRVSR
Claudin-23	SCVIQEE . VGRQCKDFDS . FLA . LPAELQVSR
Claudin-23	ICREQSS . RERECQPDENYF . QTQPQVQAR
Claudin-24	ICREQSS . RERECQPDENYF . QTQPQVQAR
Konsensus nicht-klass.	VCVDREE . VATVCKAFES . FLS . LPQELQVAR
Konsensus alle	C C

**Abbildung 49: Vergleich der Aminosäuren 53 - 81 von Mitgliedern der Claudinfamilie.** Die wirksamen Aminosäuren 53 - 81 des Cld1-Peptids sind denen der übrigen Claudine gegenübergestellt. Die Claudine wurden anhand von Sequenzähnlichkeiten in klassische und nicht-klassische Claudine eingeteilt. Angegeben sind die murinen Claudinsequenzen mit Ausnahme von Cld20, Cld21 und Cld24, von denen nur die humane Sequenz bekannt ist. Die Isoformen von Cld10 und Cld18 unterscheiden sich nur hinsichtlich ihrer 1. EZS. Für Cld23 sind zwei Sequenzen bekannt. Wiesen > 90 % bzw. > 70 % der Claudine an einer Position die gleiche AS auf, wurde die Konsensussequenz in großen bzw. kleinen Buchstaben angegeben (grün: hydrophobe Seitenkette, violett: hydrophile Seitenkette, blau: basische Seitenkette, magenta: saure Seitenkette, gelb: C, türkis: Y, schwarz: P). Der Sequenzvergleich verdeutlicht, dass kein anderes Claudin in diesen Bereichen dieselbe Sequenz wie Cld1 aufweist (modifiziert nach [Krause, 08]).

Zwei weitere, in dieser Arbeit verwendeten Peptide, deren Sequenz entweder einem Teil der 1. TMD von Cld1 oder der gesamten 2. EZS von Cld3 entsprach, hatten ebenfalls keine Wirkung auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen. Daher ist anzunehmen, dass die Reduktion der parazellulären Dichtigkeit von Epithelzellen durch Claudinpeptide eng an bestimmte Sequenzmotive gebunden ist.

#### **4.2.2 *Clostridium perfringens* Enterotoxin**

Natives CPE, das seine Wirkung durch Lyse der befallenen Zellen entfaltet, wird in der experimentellen Tumorforschung angewandt. Zur ausschließlich reversiblen Öffnung von Cld3 und/oder Cld4-haltigen TJ werden hingegen verschiedene CPE-Deletionsmutanten verwendet, denen der zytotoxische Strukturbereich fehlt. Diesen CPE-Konstrukten fehlen in der Regel die 183 N-terminalen Aminosäuren (CPE<sub>184-319</sub> bzw. C-CPE). C-CPE senkt zwar den parazellulären Widerstand der behandelten Zellen, ohne jedoch diese zu lysieren [Sonoda, 99; Masuyama, 05; Takahashi, 05; Harada, 07]. In dieser Arbeit wurde die Wirkung zweier bisher nicht untersuchter CPE-Deletionsmutanten auf den TER von Epithelzellen untersucht. Dabei umfasste GST-CPE<sub>116-319</sub> mit den Aminosäuren 116 - 183 einen Strukturbereich, dessen Funktion gegenwärtig noch unbekannt ist. Das ebenfalls untersuchte GST-CPE<sub>194-319</sub> wies im Vergleich zum gängigen C-CPE eine weitere N-terminale Verkürzung auf. Beide Konstrukte unterschieden sich in ihrer Wirkung auf Ca-co-2-Zellen. So führte nur GST-CPE<sub>194-319</sub> zur Reduktion des TER, wohingegen GST-CPE<sub>116-319</sub> keinen Effekt auf den TER hatte. Interessanterweise wurde bereits bei anderen CPE-Konstrukten beschrieben, dass das jeweils kürzere Konstrukt eine höhere Wirksamkeit aufwies. So wies beispielsweise CPE<sub>45-319</sub> im Vergleich zum nativen CPE eine doppelt so hohe zytotoxische Wirkung auf [Kokai-Kun, 97]. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirksamkeit der CPE-Konstrukte könnte in der Stereometrie liegen. Bei der Bindung von GST-CPE<sub>116-319</sub> an Cld3/Cld4 entstehen größere Proteinkomplexe als bei der Bindung von GST-CPE<sub>194-319</sub>. Diese Komplexe könnten die Bindung weiterer GST-CPE-Moleküle sterisch behindern. Daher ist es denkbar, dass bei größeren CPE-Peptiden im Vergleich zu kleineren CPE-Peptiden effektiv weniger Moleküle an Cld3/Cld4 binden können, wodurch die Internalisierung des CPE-Cld3/Cld4-Komplexes und damit die Reduktion der parazellulären Dichtigkeit eingeschränkt wird.

Allerdings kann CPE<sub>194-319</sub> den TER eines intakten Caco-2-Monolayers nur dann reduzieren, wenn es von der basolateralen Zellseite appliziert wird. Dieser Befund steht mit Daten im Einklang, die bereits für C-CPE publiziert wurden. Auch C-CPE reduziert den TER von Epithelzellen nur bei basolateraler, aber nicht bei apikaler Zugabe [Sonoda, 99; Masuyama, 05; Takahashi, 05].

#### **4.2.3 Abhängigkeit der Wirkung von *tight junction*-modulierenden Peptiden vom Applikationsort**

Da Zellen im ECIS-System nur von apikaler Seite mit Wirkstoffen behandelt werden können, konnte das ECIS-System nicht eingesetzt werden, um die Wirkung von Peptiden auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen zu charakterisieren. Daher wurden diese Untersuchungen im Filterkulturmodell durchgeführt, das sowohl die apikale als auch basolaterale Behandlung von Zellen ermöglicht.

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Peptiden, die die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen reduzierten (Cld1<sub>53-81</sub>, GST-CPE<sub>194-319</sub>), war auffällig, dass ihre Wirkung bei apikaler Applikation ausblieb oder im Vergleich zur basolateralen Applikation deutlich geringer ausfiel. Somit war ihre Wirkung vom Applikationsort abhängig. Beispielsweise führte die apikale Behandlung von Caco-2-Zellen mit 300 µM Cld1<sub>53-81</sub> nach 48 h zur signifikanten Reduktion des TER. Im Gegensatz dazu führte die basolaterale Behandlung der Zellen mit der gleichen Cld1<sub>53-81</sub>-Konzentration bereits nach 24 h zur signifikanten Reduktion des TER. Bei beidseitiger Applikation wurde bereits nach 12 h eine signifikante Reduktion des TER beobachtet.

Eine mögliche mechanistische Erklärung für die Abhängigkeit der Wirksamkeit der Claudineptide vom Applikationsort lieferten Experimente mit T84-Zellen, in denen mittels Immuno-Gold-Elektronenmikroskopie gezeigt wurde, dass das Peptid Cld1<sub>53-80</sub> nach Bindung an die laterale Plasmamembran der Zellen internalisiert wird und in anschließend in der Nähe der Plasmamembran in vesikelähnlichen Strukturen lokalisiert ist [Mrsny, 08]. Daraus wurde abgeleitet, dass Cld1<sub>53-80</sub> wirken könnte, indem es an zelluläres Cld1 bindet, welches sich bereits in der lateralen Plasmamembran befindet und zu den TJ in der apikal-lateralen Plasmamembran transportiert werden soll. Infolge der Bindung von Cld1<sub>53-80</sub> an zelluläres Cld1 könnte es zu Internalisierung dieses Komplexes kommen,



wodurch das zelluläre Cld1 aus der lateralen Plasmamembran einem Einbau in die TJ nicht länger zur Verfügung stünde. Dies würde zu einem langsamen Verlust von Cld1 aus den TJ führen, da Claudine aus den TJ ständig über der Plasmamembran zirkulieren [Mrsny, 08]. Der Verlust von Cld1 aus den TJ würde wiederum unmittelbar zur ineffektiveren Abdichtung des parazellulären Spalts führen. Dieser Wirkmechanismus liefert eine Erklärungsmöglichkeit für die stärkere Wirksamkeit der Peptide bei basolateraler Applikation im Vergleich zur apikalen Zugabe. Der synergistische Effekt, der bei beidseitiger Applikation beobachtet wurde, könnte darauf beruhen, dass durch die Öffnung der TJ durch das basolateral applizierte Peptid die Zugänglichkeit des zellulären Zielproteins, zum Beispiel Cld1, für das apikal applizierte Peptid erhöht. Damit könnte effektiv eine größere Peptidmenge auf das zelluläre Zielprotein einwirken.

Aus dem Wirkmechanismus des Cld1<sub>53-80</sub> wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Wirkung von Claudinpeptiden auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen durch Bindung des Peptids an das jeweils entsprechende zelluläre Claudin in den TJ und anschließende Internalisierung des Komplexes vermittelt werden könnte [Mrsny, 08]. Nach diesem putativen Wirkmechanismus hätte das Peptid Cld2<sub>53-81</sub> an zelluläres Cld2 gebunden und zu dessen Internalisierung geführt. Die Abreicherung des ionenporenbildenden Cld2 hätte zur Erhöhung der parazellulären Dichtigkeit und damit zur Erhöhung des TER führen können. Da allerdings Cld2<sub>53-81</sub> und Cld5<sub>53-81</sub> den TER von Caco-2-Zellen, die Cld2 endogen exprimieren [Fujita, 08], und MDCK-II-Zellen, die Cld5<sub>wt</sub> stabil exprimieren, nicht beeinflusst, ist der für die Wirkung des Cld1<sub>53-80</sub> vorgeschlagene Mechanismus nicht auf diese Claudine übertragbar.

Auch der Effekt von GST-CPE<sub>194-319</sub> war davon abhängig, ob die Behandlung von apikaler oder basaler Seite erfolgte. Wie bei den Claudinpeptiden hatte dieselbe Konzentration von GST-CPE<sub>194-319</sub> eine stärkere Wirkung auf den TER, wenn CPE von der basolateralen Seite appliziert wurde. Eine mögliche Erklärung liefert die Hypothese, dass GST-CPE<sub>194-319</sub> besser an zelluläres Cld3 und Cld4 bindet, so lange diese Claudine noch nicht in die TJ-Stränge inkorporiert wurden. Folglich würde die Bindung von GST-CPE<sub>194-319</sub> an Cld3 und Cld4 vermutlich außerhalb der TJ in der basolateralen Plasmamembran erfolgen.

### 4.3 Probleme bei der Messung des parazellulären Widerstands

In dieser Arbeit wurde der parazelluläre Widerstand sowohl im Filterkultursystem mittels Silber-Silberchlorid-Handelektrode und Volt-Ohm-Meter bei Gleichstrom als auch im ECIS-System bei Wechselstrom bestimmt. Im Vergleich zum klassischen Filterkultursystem bieten ECIS-Messungen den Vorteil, dass sie sensitiver sind. Außerdem ist kein konfluenter *Monolayer* notwendig, um Widerstände messen zu können. Es können bereits Widerstände gemessen werden, wenn sich einige Zellen auf den Elektroden der ECIS-Träger befinden. Beim Filterkultursystem hingegen kann erst dann ein vom zellfreien Filter verschiedener Widerstand gemessen werden, wenn der *Monolayer* keine Löcher mehr aufweist. Weitere Vorteile der ECIS-Messung bestehen in der automatischen und kontinuierlichen Detektion und Aufzeichnung des Widerstands während einer ausgewählten Zeitspanne und der konstanten Position der Elektrode, so dass immer an der gleichen Stelle des *Zellmonolayers* gemessen wird. Die Messung des Widerstands im Filterkultursystem mittels Silber-Silberchlorid-Handelektrode erfolgt manuell. Daher besteht immer die Gefahr, dass an einem relevanten Zeitpunkt keine Daten erhoben werden. Außerdem schwanken die gemessenen Widerstände in Abhängigkeit vom Winkel, in dem die Elektrode in das Zellkulturmedium gehalten wird und von der Position auf dem Filter, an dem die Messung erfolgt.

Ein weiter entscheidender Unterschied zwischen dem klassischen Filterkultursystem und dem ECIS-System besteht darin, dass der im ECIS-System gemessene Gesamtwiderstand (Impedanz) zwischen dem parazellulären Widerstand  $R_b$  und dem Widerstand  $\alpha$ , der aus der Adhäsion der Zellen an das Substrat resultiert, unterschieden werden kann. Im Gegensatz dazu wird im klassischen Filterkultursystem stets der Gesamtwiderstand bestimmt. So können Zelllinien, die stark an die Filteroberfläche adhärieren, jedoch gleichzeitig den parazellulären Spalt nur schwach abdichten, dieselben Widerstände ausbilden, wie Zelllinien, die schwach an die Oberfläche des Filters adhärieren, jedoch dichte TJ ausbilden [Lo, 99]. Ein direkter Vergleich der Widerstände verschiedener Zelllinien sollte daher immer unter Berücksichtigung dieses Aspekts vorgenommen werden.

Die Kultivierung von Epithel- bzw. Endothelzellen auf Zellkulturfiltern bietet aber auch entscheidende Vorteile, die für die Befunde dieser Arbeit besonders relevant waren. Beim Aussäen von Zellen auf Zellkulturfiltern ergeben sich ein separates apikales und basales Kompartiment, die mit Kulturmedium befüllt werden können. Im Gegensatz dazu

werden die Zellen im ECIS-System direkt auf Elektroden ausgesät und mit Kulturmedium überschichtet, so dass kein basales Kompartiment existiert. Daher kann die parazelluläre Permeation von Molekülen, wie beispielsweise FNS und FD10, von einem Kompartiment in das andere nur im Filterkultursystem gemessen werden. Ferner können Wirkstoffe beim ECIS-System nur in ein, beim Filterkultursystem hingegen in zwei verschiedene Kompartimente appliziert werden. Daher kann nur im Filterkultursystem untersucht werden, ob Effekte von Wirkstoffen vom Applikationsort abhängig sind. Des Weiteren entspricht die Abgrenzung eines apikalen und basalen Kompartiments eher den physiologischen Wachstumsbedingungen von Epithel- und Endothelzellen. Bei Endothelzellen stellt das Blut das apikale Kompartiment dar und bei Epithelzellen die jeweilige innere bzw. äußere Körperoberfläche. Das basale Kompartiment wird sowohl bei Endothel- als auch bei Epithelzellen von den jeweils angrenzenden Zellschichten gebildet. Es wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen, dass sowohl Endothel- als auch Epithelzellen nur nach Kultivierung auf Zellkulturfiltern ausreichend polarisieren, um ihre parazellulären Barriereigenschaften vollständig auszubilden [Butor, 92]. Daher ist denkbar, dass eine ungenügende Polarisierung der stabil mit FLAG-Cld5-Proteinen transfizierten MDCK-II-Zellen während der Kultivierung in den Kammern der ECIS-Träger dazu führte, dass die Zellen keine adäquate parazellulären Barriereigenschaften ausbilden. Dies könnte dazu führen oder dazu beitragen, dass im ECIS-System kein Unterschied zwischen dem TER der FLAG-Cld5<sub>wt</sub>-, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>- oder Kontrollvektor-exprimierenden MDCK-II-Zellen detektieren wurde (3.1.6.1).

Um auszuschließen, dass allein die unterschiedliche Messtechniken für die widersprüchlichen Ergebnisse der parazellulären Widerstandsmessung mittels klassischem Filterkultursystem und ECIS-System verantwortlichen waren, wurde eine weitere Technik zur Bestimmung des parazellulären Widerstands angewandt. Das CellZScope Impedanzmessgerät, das von der Firma nanoAnalytics freundlicherweise zu Testzwecken zur Verfügung gestellt wurde, verbindet die Vorteile der Kultivierung der Zellen auf Zellkulturfiltern mit den Vorteilen der permanenten, automatischen Detektion und Aufzeichnung der Impedanz. In diesen Messungen wurden die Unterschiede zwischen dem TER der FLAG-Cld5<sub>wt</sub>-, FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>- und Kontrollvektor-exprimierenden MDCK-II-Zellen reproduziert (3.1.6.1). Daraus wird geschlussfolgert, dass die Kulturbedingungen der stabil transfizierten MDCK-II-Zellen zur Ausbildung ihrer parazellulären Barriereigenschaften beitragen.

Obwohl der parazelluläre Widerstand stets auf die Fläche normiert wird, ist der Vergleich der Ergebnisse von Widerstandsmessungen verschiedener Arbeitsgruppen oft schwierig, da zahlreiche Faktoren die Messwerte beeinflussen. Beispielsweise ergeben sich durch die Verwendung verschiedener Zellkulturfilter, die sich hinsichtlich des Filtermaterials, der Porenanzahl und des Porendurchmessers unterscheiden, Diskrepanzen [Butor, 92]. Außerdem gibt es kein Kulturmedium, in dem Untersuchungen zur parazellulären Dichtigkeit standardmäßig durchgeführt werden. Daher führen einige Arbeitsgruppen die Permeationsmessungen in D-MEM durch, während andere Arbeitsgruppe stattdessen bestimmte Puffer nutzen [Volpe, 08]. Da sich diese unterschiedlichen Medien hinsichtlich der Konzentration ihrer frei verfügbaren Ladungsträger unterscheiden, ergeben sich unterschiedliche parazelluläre Dichtigkeiten. Doch nicht nur allein unterschiedliche Materialien und Medien machen den Vergleich publizierter Ergebnisse schwierig. Zudem können sich Zellen im Laufe ihrer Kultivierung verändern oder dedifferenzieren [Volpe, 08]. Beispielsweise wurden für Caco-2-Zellen TER-Werte im Bereich zwischen 100 und 1000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  veröffentlicht [Jarvis, 99; Masuyama, 05; Suzuki, 06].

Dennoch liefern sowohl TER-Messungen als auch ECIS-Messungen aussagekräftige Ergebnisse, wenn die entsprechenden Rahmenbedingungen berücksichtigt werden. Für diese Arbeit erwies sich die Kultivierung der stabilen FLAG-Cld5-MDCK-II-Zellklone auf Zellkulturfiltern als die geeignete Methode, um Unterschiede zwischen FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, den FLAG-Cld5-Mutanten und der Vektorkontrolle zu detektieren. Werden jedoch identische Zellen untersucht, die beispielsweise mit verschiedenen Wirkstoffen behandelt wurden, kann von der höheren Sensitivität des ECIS-Systems profitiert werden. Ein Beispiel dafür liefern die hCMEC/D3, die nach Aussaat auf Zellkulturfiltern sowohl bei der Widerstandsmessung mit der Handelektrode als auch mit dem CellZScope im Vergleich zum zellfreien Filter nur unwesentlich höhere Widerstände ausbildeten. Dass die Zellen jedoch auf den Filtern einen konfluenten *Monolayer* ausbilden, wird erst daran ersichtlich, dass Membrankapazität nach der Aussaat der Zellen kontinuierlich abnahm, wohingegen die Membrankapazität der zellfreien Filter konstant blieb [Wegener, 00]. Beim Messen der Impedanz im ECIS-System wurden jedoch auch für hCMEC/D3 Widerstände gemessen, die sich von den zellfreien Elektroden unterschieden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund werden die parazellulären Widerstände von Endothelzellen häufig mit dem ECIS-System gemessen [Schreibelt, 07; Hartmann, 07; Fontijn, 08]. Die hohe Sensitivität des ECIS-Systems sollte genutzt werden, um die Wirksamkeit von neuen CPE-

Konstrukten und Claudinpeptiden auf die Integrität der TJ zu untersuchen. Allerdings zeigte sich durch die Verwendung von Zellkulturfiltern, dass lediglich die basolaterale Applikation zur Senkung der parazellulären Dichtigkeit führt. Daher ist der Einsatz des ECIS-Systems nur dann sinnvoll, wenn sichergestellt werden kann, dass die zu testende Substanz bei apikaler Anwendung wirksam ist.

## 5 Schlussfolgerung

Bisher war bekannt, dass die 2. EZS der Claudine an deren Oligomerisierung und an der CPE-Rezeptorfunktion beteiligt ist [Piontek, 08; Fujita, 00]. Im Gegensatz dazu wurde der Einfluss dieses Strukturbereichs auf die parazelluläre Dichtigkeit von epithelialen und endothelialen Zellen bisher noch nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass einzelne Aminosäuren in der 2. EZS von Cld5 für die parazelluläre Dichtigkeit von epithelialen Zellen essentiell sind. Die Substitution dieser Aminosäuren in stabil exprimierten FLAG-Cld5-Proteinen verhinderte in MDCK-II-Zellen die Erhöhung des TER und die Reduktion der parazellulären Permeation von FDS durch Cld5<sub>wt</sub>.

Die Aminosäuresubstitutionen Y148A, Y158A und E159Q führten in HEK-293-Zellen zum Verlust der homophilen Cld5-*trans*-Interaktionen. Die stabile Expression von FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub>, FLAG-Cld5<sub>Y158A</sub> und FLAG-Cld5<sub>E159Q</sub> in MDCK-II-Zellen führte zwar nicht zur Veränderung der TJ-Strangmorphologie, verhinderten aber die Erhöhung des parazellulären Widerstands durch FLAG-Cld5<sub>wt</sub> und erhöhten die parazelluläre Permeation von FDS und FD10. Folglich führt die Expression dieser FLAG-Cld5-Mutanten zu Störungen der TJ-Integrität. In weiterführenden Experimenten könnte untersucht werden, ob die Abnahme der parazellulären Dichtigkeit allein auf die fehlenden homophilen *trans*-Interaktionen der *disjunction*-Mutanten zurückzuführen ist oder ob zusätzlich die heterophilen *trans*-Interaktionen der Cld5-Mutanten mit anderen Claudinen beeinträchtigt sind. Der elektronenmikroskopische Vergleich der TJ-Morphologie in MDCK-II-Zellen, die FLAG-Cld5<sub>wt</sub> bzw. FLAG-Cld5<sub>Y148A</sub> stabil exprimierten, lieferte eventuell einen Hinweis auf mögliche heterophile Cld5-*trans*-Interaktionen. Obwohl die homophilen Cld5-*trans*-Interaktionen der FLAG-Cld5-Mutanten blockiert waren, wurden im Vergleich zu FLAG-Cld5<sub>wt</sub> keine Unterschiede in der TJ-Strangmorphologie gefunden. Bei Blockierung sämtlicher Cld5-*trans*-Interaktionen sollte keine kontinuierliche TJ-Strangausbildung möglich sein. Daher könnten die untersuchten Aminosäuresubstitutionen in der 2. EZS von FLAG-Cld5 ausschließlich die homophilen Cld5-*trans*-Interaktionen blockieren, die heterophilen Cld5-*trans*-Interaktionen jedoch unbeeinflusst lassen.

Die Mutante FLAG-Cld5<sub>R145A</sub> wies in HEK-293-Zellen, wie FLAG-Cld5<sub>wt</sub>, eine Kontaktanreicherung in den Plasmamembranen benachbarter transfizierten Zellen auf. Allerdings

fürte die stabile Expression von FLAG-Cld5<sub>R145A</sub> in MDCK-II-Zellen im Gegensatz zu FLAG-Cld5<sub>wt</sub> nicht zur Erhöhung des TER, aber zur Erhöhung der parazellulären Permeation von FDS. Damit kommt der Aminosäure R145 von Cld5 eine Bedeutung bei der Abdichtung des parazellulären Spalts zu, die in bisherigen Strukturmodellen noch nicht berücksichtigt wurde. Die positiv geladene Seitenkette von R145 könnte die Permeation von kleinen Kationen einschränken und damit zur abdichtenden Wirkung von FLAG-Cld5<sub>wt</sub> beitragen. Durch den Austausch der positiv geladenen Aminosäure R145 durch die ungeladene Aminosäure A demnach zum Verlust der Abdichtung gegenüber Kationen und damit zur Reduktion des TER führen.

Die Aminosäuresubstitution K157A von Cld5 führte in HEK-293- und MDCK-II-Zellen zum Verlust der Plasmamembranlokalisation des Proteins. Die stabile Expression von FLAG-Cld5<sub>K157A</sub> in MDCK-II-Zellen hatte zwar keine Wirkung auf den TER und die parazelluläre Permeation von FD10, erhöhte jedoch die parazelluläre Permeation von FDS. Gleichzeitig waren in diesen Zellen die Expression und subzelluläre Lokalisation endogener TJ-Proteine, wie beispielsweise Occludin, Cld1 und ZO-1, im Vergleich zur Vektorkontrolle bzw. zu FLAG-Cld5<sub>wt</sub> unverändert. Allerdings wiesen die FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen im Gegensatz zu den FLAG-Cld5<sub>wt</sub>-exprimierenden MDCK-II-Zellen einen fast vollständigen Verlust der Lokalisation von JAM-1 in der Plasmamembran auf. In weiterführenden Untersuchungen könnte analysiert werden, ob die veränderte subzelluläre Lokalisation von JAM-1 eine direkte oder indirekte Folge der Expression von FLAG-Cld5<sub>K157A</sub>. Allerdings ist eine Interaktion zwischen von Cld5 und JAM-1 bisher noch nicht beschrieben worden.

Zusammenfassend tragen diese Untersuchungen zu einem verbesserten Verständnis der Bedeutung der Aminosäuren der 2. EZS von Cld5 für dessen parazelluläre Barriereigenschaften bei. Da Teile der Aminosäuresequenz der 2. EZS bei den Mitgliedern der Claudinfamilie hochkonserviert sind [Krause, 08], könnte dieser Strukturbereich auch für die parazellulären Barriereigenschaften der übrigen Claudine relevant sein.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung von Peptiden auf die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen charakterisiert. Da die Peptide Cld1<sub>53-81</sub> und CPE<sub>194-319</sub> die parazelluläre Dichtigkeit von Epithelzellen senken, stellen sie neue Ansätze zur Behandlung von Erkrankungen dar, deren Therapie momentan aufgrund gewebeabdichtender TJ, zum Beispiel in der Blut-Hirn-Schranke, eingeschränkt bzw. nicht möglich ist. Für eine

effiziente therapeutische Nutzung von Cld1<sub>53-81</sub> und CPE<sub>194-319</sub> ist es notwendig, die Wirkung bei apikaler Zugabe zu erhöhen. Da bei einer systemischen Applikation ist nur der apikale Bereich der Zellen zugänglich, wären die Peptide nicht wirksam, wenn ihre Wirksamkeit auf die basolaterale Zellseite beschränkt ist. Bei neuen Ansätzen zur selektiven Öffnung der Blut-Gewebe-Schranken werden Claudine auch in Zukunft eine wichtige Rolle spielen, beispielsweise als therapeutische Zielstruktur (*target*) für TJ-modulierende Substanzen, als Ausgangsbasis für das Design neuer TJ-modulierender Claudinpeptide oder als Rezeptoren für C-CPE. Dieses Fragment des Toxins CPE ist therapeutisch besonders interessant, da die Expression seiner Rezeptoren, Cld3 und Cld4, bei zahlreichen Tumorerkrankungen erhöht ist. Folglich könnte C-CPE zur Reduktion der parazellulären Permeabilität eingesetzt werden, die wiederum zur gezielten und temporär begrenzten Einschleusung von Wirkstoffen ins Tumorgewebe genutzt werden könnte. Um C-CPE auch für die Öffnung der BHS nutzen zu können, könnte seine Struktur in weiterführenden Untersuchungen so verändert werden, dass es an die Claudine der BHS, beispielsweise Cld1, Cld5, Cld12, bindet und darüber eine Reduktion der parazellulären Dichtigkeit vermittelt. Zusammenfassend wurden im zweiten Teil die Wirkungen TJ-modulierender Substanzen genauer charakterisiert und Strategien für die gezielte Beeinflussung der Claudine und damit der parazellulären Dichtigkeit von TJ diskutiert.



## Referenzen

- Abuazza, G.; Becker, A.; Williams, S. S.; Chakravarty, S.; Truong, H. T.; Lin, F. und Baum, M. (2006): Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins, *Am.J.Physiol Renal Physiol* (Band 291), Nr. 6, Seite F1132-F1141. URL: PM:16774906
- Achler, C.; Filmer, D.; Merte, C. und Drenckhahn, D. (1989): Role of microtubules in polarized delivery of apical membrane proteins to the brush border of the intestinal epithelium, *J.Cell Biol.* (Band 109), Nr. 1, Seite 179-189. URL: PM:2568363
- Alexandre, M. D.; Lu, Q. und Chen, Y. H. (2005): Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl<sup>-</sup> conductance and increases the paracellular Na<sup>+</sup> conductance in LLC-PK1 cells, *J.Cell Sci.* (Band 118), Nr. Pt 12, Seite 2683-2693. URL: PM:15928046
- Amasheh, S.; Meiri, N.; Gitter, A. H.; Schoneberg, T.; Mankertz, J.; Schulzke, J. D. und Fromm, M. (2002): Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells, *J.Cell Sci.* (Band 115), Nr. Pt 24, Seite 4969-4976. URL: PM:12432083
- Amasheh, S.; Schmidt, T.; Mahn, M.; Florian, P.; Mankertz, J.; Tavalali, S.; Gitter, A. H.; Schulzke, J. D. und Fromm, M. (2005): Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells, *Cell Tissue Res.* (Band 321), Nr. 1, Seite 89-96. URL: PM:16158492
- Anderson, J. M.; Fanning, A. S.; Lapierre, L. und Van Itallie, C. M. (1995): Zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: membrane-associated guanylate kinase homologues (MAGuKs) of the tight junction, *Biochem.Soc.Trans.* (Band 23), Nr. 3, Seite 470-475. URL: PM:8566365
- Ando-Akatsuka, Y.; Saitou, M.; Hirase, T.; Kishi, M.; Sakakibara, A.; Itoh, M.; Yonemura, S.; Furuse, M. und Tsukita, S. (1996): Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues, *J.Cell Biol.* (Band 133), Nr. 1, Seite 43-47. URL: PM:8601611
- Angelow, S.; Ahlstrom, R. und Yu, A. S. (2008): Biology of Claudins, *Am.J.Physiol Renal Physiol.* URL: PM:18480174
- Angelow, S.; El Hussein, R.; Kanzawa, S. A. und Yu, A. S. (2007a): Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19, *Am.J.Physiol Renal Physiol* (Band 293), Nr. 1, Seite F166-F177. URL: PM:17389678
- Angelow, S.; Kim, K. J. und Yu, A. S. (2006): Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells, *J.Physiol* (Band 571), Nr. Pt 1, Seite 15-26. URL: PM:16322055
- Angelow, S.; Schneeberger, E. E. und Yu, A. S. (2007b): Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2, *J.Membr.Biol.* (Band 215), Nr. 2-3, Seite 147-159. URL: PM:17516019
- Arabzadeh, A.; Troy, T. C. und Turksen, K. (2006): Role of the Cldn6 cytoplasmic tail domain in membrane targeting and epidermal differentiation in vivo, *Mol.Cell Biol.* (Band 26), Nr. 15, Seite 5876-5887. URL: PM:16847338
- Arndt, S.; Seebach, J.; Psathaki, K.; Galla, H. J. und Wegener, J. (2004): Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis, *Biosens.Bioelectron.* (Band 19), Nr. 6, Seite 583-594. URL: PM:14683642
- Bagnat, M.; Cheung, I. D.; Mostov, K. E. und Stainier, D. Y. (2007): Genetic control of single lumen formation in the zebrafish gut, *Nat.Cell Biol.* (Band 9), Nr. 8, Seite 954-960. URL: PM:17632505
- Balda, M. S.; Flores-Maldonado, C.; Cereijido, M. und Matter, K. (2000): Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability, *J.Cell Biochem.* (Band 78), Nr. 1, Seite 85-96. URL: PM:10797568

- Balda, M. S.; Gonzalez-Mariscal, L.; Matter, K.; Cereijido, M. und Anderson, J. M. (1993): Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol, *J.Cell Biol.* (Band 123), Nr. 2, Seite 293-302. URL: PM:8408213
- Balda, M. S. und Matter, K. (1998): Tight junctions, *J.Cell Sci.* (Band 111 ( Pt 5)), Seite 541-547. URL: PM:9454728
- Balda, M. S.; Whitney, J. A.; Flores, C.; Gonzalez, S.; Cereijido, M. und Matter, K. (1996): Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein, *J.Cell Biol.* (Band 134), Nr. 4, Seite 1031-1049. URL: PM:8769425
- Balkovetz, D. F. (2006): Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability, *Am.J.Physiol Renal Physiol* (Band 290), Nr. 3, Seite F572-F579. URL: PM:16461756
- Barker, G. und Simmons, N. L. (1981): Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties, *Q.J.Exp.Physiol* (Band 66), Nr. 1, Seite 61-72. URL: PM:6911762
- Barth, A. I.; Pollack, A. L.; Altschuler, Y.; Mostov, K. E. und Nelson, W. J. (1997): NH2-terminal deletion of beta-catenin results in stable colocalization of mutant beta-catenin with adenomatous polyposis coli protein and altered MDCK cell adhesion, *J.Cell Biol.* (Band 136), Nr. 3, Seite 693-706. URL: PM:9024698
- Barton, E. S.; Forrest, J. C.; Connolly, J. L.; Chappell, J. D.; Liu, Y.; Schnell, F. J.; Nusrat, A.; Parkos, C. A. und Dermody, T. S. (2001): Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus, *Cell* (Band 104), Nr. 3, Seite 441-451. URL: PM:11239401
- Bazzoni, G. (2003): The JAM family of junctional adhesion molecules, *Curr.Opin.Cell Biol.* (Band 15), Nr. 5, Seite 525-530. URL: PM:14519386
- Bazzoni, G.; Martinez-Estrada, O. M.; Mueller, F.; Nelboeck, P.; Schmid, G.; Bartfai, T.; Dejana, E. und Brockhaus, M. (2000): Homophilic interaction of junctional adhesion molecule, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 40, Seite 30970-30976. URL: PM:10913139
- Ben Yosef, T.; Belyantseva, I. A.; Saunders, T. L.; Hughes, E. D.; Kawamoto, K.; Van Itallie, C. M.; Beyer, L. A.; Halsey, K.; Gardner, D. J.; Wilcox, E. R.; Rasmussen, J.; Anderson, J. M.; Dolan, D. F.; Forge, A.; Raphael, Y.; Camper, S. A. und Friedman, T. B. (2003): Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration, *Hum.Mol.Genet.* (Band 12), Nr. 16, Seite 2049-2061. URL: PM:12913076
- Brightman, M. W. und Reese, T. S. (1969): Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain, *J.Cell Biol.* (Band 40), Nr. 3, Seite 648-677. URL: PM:5765759
- Bross, P.; Corydon, T. J.; Andresen, B. S.; Jorgensen, M. M.; Bolund, L. und Gregersen, N. (1999): Protein misfolding and degradation in genetic diseases, *Hum.Mutat.* (Band 14), Nr. 3, Seite 186-198. URL: PM:10477427
- Broughman, J. R.; Brandt, R. M.; Hastings, C.; Iwamoto, T.; Tomich, J. M. und Schultz, B. D. (2004): Channel-forming peptide modulates transepithelial electrical conductance and solute permeability, *Am.J.Physiol Cell Physiol* (Band 286), Nr. 6, Seite C1312-C1323. URL: PM:15151917
- Brown, R. C.; Egleton, R. D. und Davis, T. P. (2004): Mannitol opening of the blood-brain barrier: regional variation in the permeability of sucrose, but not 86Rb+ or albumin, *Brain Res.* (Band 1014), Nr. 1-2, Seite 221-227. URL: PM:15213006
- Butor, C. und Davoust, J. (1992): Apical to basolateral surface area ratio and polarity of MDCK cells grown on different supports, *Exp.Cell Res.* (Band 203), Nr. 1, Seite 115-127. URL: PM:1426034
- Butt, A. M.; Jones, H. C. und Abbott, N. J. (1990): Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study, *J.Physiol* (Band 429), Seite 47-62. URL: PM:2277354

- Campbell, M.; Kiang, A. S.; Kenna, P. F.; Kerskens, C.; Blau, C.; O'Dwyer, L.; Tivnan, A.; Kelly, J. A.; Brankin, B.; Farrar, G. J. und Humphries, P. (2008): RNAi-mediated reversible opening of the blood-brain barrier, *J.Gene Med.* (Band 10), Nr. 8, Seite 930-947. URL: PM:18509865
- Cereijido, M.; Robbins, E. S.; Dolan, W. J.; Rotunno, C. A. und Sabatini, D. D. (1978): Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support, *J.Cell Biol.* (Band 77), Nr. 3, Seite 853-880. URL: PM:567227
- Cereijido, M.; Shoshani, L. und Contreras, R. G. (2000): Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity, *Am.J.Physiol Gastro-intest.Liver Physiol* (Band 279), Nr. 3, Seite G477-G482. URL: PM:10960345
- Cereijido, M.; Valdes, J.; Shoshani, L. und Contreras, R. G. (1998): Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity, *Annu.Rev.Physiol* (Band 60), Seite 161-177. URL: PM:9558459
- Chang, Y. S.; Tseng, S. Y.; Tseng, S. H.; Chen, Y. T. und Hsiao, J. H. (2005): Comparison of dyes for cataract surgery. Part 1: cytotoxicity to corneal endothelial cells in a rabbit model, *J.Cataract Refract.Surg.* (Band 31), Nr. 4, Seite 792-798. URL: PM:15899458
- Chen, S. C.; Eiting, K.; Cui, K.; Leonard, A. K.; Morris, D.; Li, C. Y.; Farber, K.; Sileno, A. P.; Houston, M. E., Jr.; Johnson, P. H.; Quay, S. C. und Costantino, H. R. (2006): Therapeutic utility of a novel tight junction modulating peptide for enhancing intranasal drug delivery, *J.Pharm.Sci.* (Band 95), Nr. 6, Seite 1364-1371. URL: PM:16625659
- Chen-Quay, S. C.; Eiting, K. T.; Li, A. W.; Lamharzi, N. und Quay, S. C. (2008): Identification of tight junction modulating lipids, *J.Pharm.Sci.* URL: PM:18563833
- Claude, P. (1978): Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens, *J.Membr.Biol.* (Band 39), Nr. 2-3, Seite 219-232. URL: PM:641977
- Claude, P. und Goodenough, D. A. (1973): Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia, *J.Cell Biol.* (Band 58), Nr. 2, Seite 390-400. URL: PM:4199658
- Cohen, C. J.; Shieh, J. T.; Pickles, R. J.; Okegawa, T.; Hsieh, J. T. und Bergelson, J. M. (2001): The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 98), Nr. 26, Seite 15191-15196. URL: PM:11734628
- Colegio, O. R.; Van Itallie, C.; Rahner, C. und Anderson, J. M. (2003): Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture, *Am.J.Physiol Cell Physiol* (Band 284), Nr. 6, Seite C1346-C1354. URL: PM:12700140
- Colegio, O. R.; Van Itallie, C. M.; McCrea, H. J.; Rahner, C. und Anderson, J. M. (2002): Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells, *Am.J.Physiol Cell Physiol* (Band 283), Nr. 1, Seite C142-C147. URL: PM:12055082
- Coyne, C. B. und Bergelson, J. M. (2005): CAR: a virus receptor within the tight junction, *Adv.Drug Deliv.Rev.* (Band 57), Nr. 6, Seite 869-882. URL: PM:15820557
- Coyne, C. B.; Gambling, T. M.; Boucher, R. C.; Carson, J. L. und Johnson, L. G. (2003): Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability, *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* (Band 285), Nr. 5, Seite L1166-L1178. URL: PM:12909588
- D'Atri, F. und Citi, S. (2002): Molecular complexity of vertebrate tight junctions (Review), *Mol.Membr.Biol.* (Band 19), Nr. 2, Seite 103-112. URL: PM:12126228
- D'Souza, T.; Agarwal, R. und Morin, P. J. (2005): Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells, *J.Biol.Chem.* (Band 280), Nr. 28, Seite 26233-26240. URL: PM:15905176
- Ebnet, K. (2008): Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions, *Histochem.Cell Biol.* (Band 130), Nr. 1, Seite 1-20. URL: PM:18365233
- Ebnet, K.; Schulz, C. U.; Meyer Zu Brickwedde, M. K.; Pendl, G. G. und Vestweber, D. (2000): Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 36, Seite 27979-27988. URL: PM:10856295

- Enck, A. H.; Berger, U. V. und Yu, A. S. (2001): Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney, *Am.J.Physiol Renal Physiol* (Band 281), Nr. 5, Seite F966-F974. URL: PM:11592954
- Erdlenbruch, B.; Schinkhof, C.; Kugler, W.; Heinemann, D. E.; Herms, J.; Eibl, H. und Lakomek, M. (2003): Intracarotid administration of short-chain alkylglycerols for increased delivery of methotrexate to the rat brain, *Br.J.Pharmacol.* (Band 139), Nr. 4, Seite 685-694. URL: PM:12812991
- Evans, M. J.; von Hahn, T.; Tscherne, D. M.; Syder, A. J.; Panis, M.; Wolk, B.; Hatzioannou, T.; McKeating, J. A.; Bieniasz, P. D. und Rice, C. M. (2007): Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry, *Nature* (Band 446), Nr. 7137, Seite 801-805. URL: PM:17325668
- Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (1999): PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane, *J.Clin.Invest* (Band 103), Nr. 6, Seite 767-772. URL: PM:10079096
- Fanning, A. S.; Jameson, B. J.; Jesaitis, L. A. und Anderson, J. M. (1998): The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton, *J.Biol.Chem.* (Band 273), Nr. 45, Seite 29745-29753. URL: PM:9792688
- FARQUHAR, M. G. und PALADE, G. E. (1963): Junctional complexes in various epithelia, *J.Cell Biol.* (Band 17), Seite 375-412. URL: PM:13944428
- Fedwick, J. P.; Lapointe, T. K.; Meddings, J. B.; Sherman, P. M. und Buret, A. G. (2005): Helicobacter pylori activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability, *Infect.Immun.* (Band 73), Nr. 12, Seite 7844-7852. URL: PM:16299274
- Florey (1966): The endothelial cell, *Br.Med.J.* (Band 2), Nr. 5512, Seite 487-490. URL: PM:5913081
- Folpe, A. L.; Billings, S. D.; McKenney, J. K.; Walsh, S. V.; Nusrat, A. und Weiss, S. W. (2002): Expression of claudin-1, a recently described tight junction-associated protein, distinguishes soft tissue perineurioma from potential mimics, *Am.J.Surg.Pathol.* (Band 26), Nr. 12, Seite 1620-1626. URL: PM:12459629
- Fontijn, R. D.; Rohlena, J.; van Marle, J.; Pannekoek, H. und Horrevoets, A. J. (2006): Limited contribution of claudin-5-dependent tight junction strands to endothelial barrier function, *Eur.J.Cell Biol.* URL: PM:16959372
- Fontijn, R. D.; Volger, O. L.; Fledderus, J. O.; Reijerkerk, A.; de Vries, H. E. und Horrevoets, A. J. (2008): SOX-18 controls endothelial-specific claudin-5 gene expression and barrier function, *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* (Band 294), Nr. 2, Seite H891-H900. URL: PM:18065521
- Forrest, J. C.; Campbell, J. A.; Schelling, P.; Stehle, T. und Dermody, T. S. (2003): Structure-function analysis of reovirus binding to junctional adhesion molecule 1. Implications for the mechanism of reovirus attachment, *J.Biol.Chem.* (Band 278), Nr. 48, Seite 48434-48444. URL: PM:12966102
- Forster, C. (2008): Tight junctions and the modulation of barrier function in disease, *Histochem.Cell Biol.* (Band 130), Nr. 1, Seite 55-70. URL: PM:18415116
- Forster, C.; Kahles, T.; Kietz, S. und Drenckhahn, D. (2007): Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND, *J.Physiol* (Band 580), Nr. Pt.3, Seite 937-949. URL: PM:17317742
- Fujibe, M.; Chiba, H.; Kojima, T.; Soma, T.; Wada, T.; Yamashita, T. und Sawada, N. (2004): Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions, *Exp.Cell Res.* (Band 295), Nr. 1, Seite 36-47. URL: PM:15051488
- Fujita, H.; Sugimoto, K.; Inatomi, S.; Maeda, T.; Osanai, M.; Uchiyama, Y.; Yamamoto, Y.; Wada, T.; Kojima, T.; Yokozaki, H.; Yamashita, T.; Kato, S.; Sawada, N. und Chiba, H. (2008): Tight Junction Proteins Claudin-2 and -12 Are Critical for Vitamin D-dependent Ca<sup>2+</sup> Absorption between Enterocytes, *Mol.Biol.Cell* (Band 19), Nr. 5, Seite 1912-1921. URL: PM:18287530

- Fujita, K.; Katahira, J.; Horiguchi, Y.; Sonoda, N.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2000): Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein, FEBS Lett. (Band 476), Nr. 3, Seite 258-261. URL: PM:10913624
- Furuse, M.; Fujimoto, K.; Sato, N.; Hirase, T.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (1996): Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures, J.Cell Sci. (Band 109 ( Pt 2)), Seite 429-435. URL: PM:8838666
- Furuse, M.; Fujita, K.; Hiiragi, T.; Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1998a): Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin, J.Cell Biol. (Band 141), Nr. 7, Seite 1539-1550. URL: PM:9647647
- Furuse, M.; Furuse, K.; Sasaki, H. und Tsukita, S. (2001): Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells, J.Cell Biol. (Band 153), Nr. 2, Seite 263-272. URL: PM:11309408
- Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (1993): Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions, J.Cell Biol. (Band 123), Nr. 6 Pt 2, Seite 1777-1788. URL: PM:8276896
- Furuse, M.; Itoh, M.; Hirase, T.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (1994): Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions, J.Cell Biol. (Band 127), Nr. 6 Pt 1, Seite 1617-1626. URL: PM:7798316
- Furuse, M.; Sasaki, H.; Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1998b): A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts, J.Cell Biol. (Band 143), Nr. 2, Seite 391-401. URL: PM:9786950
- Furuse, M.; Sasaki, H. und Tsukita, S. (1999): Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands, J.Cell Biol. (Band 147), Nr. 4, Seite 891-903. URL: PM:10562289
- Furuse, M. und Tsukita, S. (2006): Claudins in occluding junctions of humans and flies, Trends Cell Biol. (Band 16), Nr. 4, Seite 181-188. URL: PM:16537104
- Gaillard, P. J.; Voorwinden, L. H.; Nielsen, J. L.; Ivanov, A.; Atsumi, R.; Engman, H.; Ringbom, C.; de Boer, A. G. und Breimer, D. D. (2001): Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes, Eur.J.Pharm.Sci. (Band 12), Nr. 3, Seite 215-222. URL: PM:11113640
- Giaever, I. und Keese, C. R. (1991): Micromotion of mammalian cells measured electrically, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (Band 88), Nr. 17, Seite 7896-7900. URL: PM:1881923
- Gonzalez-Mariscal, L.; Betanzos, A.; Nava, P. und Jaramillo, B. E. (2003): Tight junction proteins, Prog.Biophys.Mol.Biol. (Band 81), Nr. 1, Seite 1-44. URL: PM:12475568
- Gonzalez-Mariscal, L.; Contreras, R. G.; Bolivar, J. J.; Ponce, A.; Chavez, De Ramirez und Cerejido, M. (1990): Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells, Am.J.Physiol (Band 259), Nr. 6 Pt 1, Seite C978-C986. URL: PM:2124417
- Gumbiner, B.; Lowenkopf, T. und Apatira, D. (1991): Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (Band 88), Nr. 8, Seite 3460-3464. URL: PM:2014265
- Hamazaki, Y.; Itoh, M.; Sasaki, H.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2002): Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule, J.Biol.Chem. (Band 277), Nr. 1, Seite 455-461. URL: PM:11689568
- Hanna, P. C.; Mietzner, T. A.; Schoolnik, G. K. und McClane, B. A. (1991): Localization of the receptor-binding region of Clostridium perfringens enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding region, J.Biol.Chem. (Band 266), Nr. 17, Seite 11037-11043. URL: PM:1645721
- Harada, M.; Kondoh, M.; Ebihara, C.; Takahashi, A.; Komiya, E.; Fujii, M.; Mizuguchi, H.; Tsunoda, S.; Horiguchi, Y.; Yagi, K. und Watanabe, Y. (2007): Role of tyrosine residues in modulation of

- claudin-4 by the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, *Biochem.Pharmacol.* (Band 73), Nr. 2, Seite 206-214. URL: PM:17097620
- Hartmann, C.; Zozulya, A.; Wegener, J. und Galla, H. J. (2007): The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: an in vitro study, *Exp.Cell Res.* (Band 313), Nr. 7, Seite 1318-1325. URL: PM:17346702
- Haskins, J.; Gu, L.; Wittchen, E. S.; Hibbard, J. und Stevenson, B. R. (1998): ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin, *J.Cell Biol.* (Band 141), Nr. 1, Seite 199-208. URL: PM:9531559
- Hewitt, K. J.; Agarwal, R. und Morin, P. J. (2006): The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues, *BMC.Cancer* (Band 6), Seite 186. URL: PM:16836752
- Hou, J.; Gomes, A. S.; Paul, D. L. und Goodenough, D. A. (2006): Study of claudin function by RNA interference, *J.Biol.Chem.* URL: PM:17018523
- Hou, J.; Paul, D. L. und Goodenough, D. A. (2005): Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions., *J.Cell Sci.* (Band 118), Nr. Pt 21, Seite 5109-5118. URL: PM:16234325
- Hou, J.; Renigunta, A.; Konrad, M.; Gomes, A. S.; Schneeberger, E. E.; Paul, D. L.; Waldegger, S. und Goodenough, D. A. (2008): Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex, *J.Clin.Invest* (Band 118), Nr. 2, Seite 619-628. URL: PM:18188451
- Hough, C. D.; Sherman-Baust, C. A.; Pizer, E. S.; Montz, F. J.; Im, D. D.; Rosenshein, N. B.; Cho, K. R.; Riggins, G. J. und Morin, P. J. (2000): Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer, *Cancer Res.* (Band 60), Nr. 22, Seite 6281-6287. URL: PM:11103784
- Hume, E. M.; Lucas, N. S. und Smith, H. H. (1927): On the Absorption of Vitamin D from the Skin, *Biochem.J.* (Band 21), Nr. 2, Seite 362-367. URL: PM:16743844
- Ikari, A.; Hirai, N.; Shiroma, M.; Harada, H.; Sakai, H.; Hayashi, H.; Suzuki, Y.; Degawa, M. und Takagi, K. (2004): Association of paracellin-1 with ZO-1 augments the reabsorption of divalent cations in renal epithelial cells, *J.Biol.Chem.* (Band 279), Nr. 52, Seite 54826-54832. URL: PM:15496416
- Ikari, A.; Matsumoto, S.; Harada, H.; Takagi, K.; Hayashi, H.; Suzuki, Y.; Degawa, M. und Miwa, M. (2006): Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions, *J.Cell Sci.* (Band 119), Nr. Pt 9, Seite 1781-1789. URL: PM:16608877
- Ikeda, M.; Bhattacharjee, A. K.; Kondoh, T.; Nagashima, T. und Tamaki, N. (2002): Synergistic effect of cold mannitol and Na(+)/Ca(2+) exchange blocker on blood-brain barrier opening, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (Band 291), Nr. 3, Seite 669-674. URL: PM:11855842
- Ikenouchi, J.; Furuse, M.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (2005): Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells, *J.Cell Biol.* (Band 171), Nr. 6, Seite 939-945. URL: PM:16365161
- Ikenouchi, J.; Sasaki, H.; Tsukita, S.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2008): Loss of Occludin Affects Tricellular Localization of Tricellulin, *Mol.Biol.Cell.* URL: PM:18768749
- Ikenouchi, J.; Umeda, K.; Tsukita, S.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2007): Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization, *J.Cell Biol.* (Band 176), Nr. 6, Seite 779-786. URL: PM:17353356
- Inai, T.; Kobayashi, J. und Shibata, Y. (1999): Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells, *Eur.J.Cell Biol.* (Band 78), Nr. 12, Seite 849-855. URL: PM:10669103
- Ishizaki, T.; Chiba, H.; Kojima, T.; Fujibe, M.; Soma, T.; Miyajima, H.; Nagasawa, K.; Wada, I. und Sawada, N. (2003): Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways, *Exp.Cell Res.* (Band 290), Nr. 2, Seite 275-288. URL: PM:14567987
- Itoh, M.; Furuse, M.; Morita, K.; Kubota, K.; Saitou, M. und Tsukita, S. (1999): Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins, *J.Cell Biol.* (Band 147), Nr. 6, Seite 1351-1363. URL: PM:10601346

- Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Kitani-Yasuda, T.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (1993): The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy, *J.Cell Biol.* (Band 121), Nr. 3, Seite 491-502. URL: PM:8486731
- Itoh, M.; Sasaki, H.; Furuse, M.; Ozaki, H.; Kita, T. und Tsukita, S. (2001): Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions, *J.Cell Biol.* (Band 154), Nr. 3, Seite 491-497. URL: PM:11489913
- Jarvis, M. A.; Wang, C. E.; Meyers, H. L.; Smith, P. P.; Corless, C. L.; Henderson, G. J.; Vieira, J.; Britt, W. J. und Nelson, J. A. (1999): Human cytomegalovirus infection of caco-2 cells occurs at the basolateral membrane and is differentiation state dependent, *J.Virol.* (Band 73), Nr. 6, Seite 4552-4560. URL: PM:10233913
- Jeansonne, B.; Lu, Q.; Goodenough, D. A. und Chen, Y. H. (2003): Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells, *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)* (Band 49), Nr. 1, Seite 13-21. URL: PM:12839333
- Jesaitis, L. A. und Goodenough, D. A. (1994): Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein, *J.Cell Biol.* (Band 124), Nr. 6, Seite 949-961. URL: PM:8132716
- Johnson, L. G. (2005a): Applications of imaging techniques to studies of epithelial tight junctions, *Adv.Drug Deliv.Rev.* (Band 57), Nr. 1, Seite 111-121. URL: PM:15518924
- Johnson, P. H. und Quay, S. C. (2005b): Advances in nasal drug delivery through tight junction technology, *Expert.Opin.Drug Deliv.* (Band 2), Nr. 2, Seite 281-298. URL: PM:16296754
- Jovov, B.; Van Itallie, C. M.; Shaheen, N. J.; Carson, J. L.; Gambling, T. M.; Anderson, J. M. und Orlando, R. C. (2007): Claudin-18: a dominant tight junction protein in Barrett's esophagus and likely contributor to its acid resistance, *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* (Band 293), Nr. 6, Seite G1106-G1113. URL: PM:17932229
- Kahle, K. T.; Macgregor, G. G.; Wilson, F. H.; Van Hoek, A. N.; Brown, D.; Ardito, T.; Kashgarian, M.; Giebisch, G.; Hebert, S. C.; Boulpaep, E. L. und Lifton, R. P. (2004): Paracellular Cl<sup>-</sup> permeability is regulated by WNK4 kinase: insight into normal physiology and hypertension, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 101), Nr. 41, Seite 14877-14882. URL: PM:15465913
- Katahira, J.; Inoue, N.; Horiguchi, Y.; Matsuda, M. und Sugimoto, N. (1997a): Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin, *J.Cell Biol.* (Band 136), Nr. 6, Seite 1239-1247. URL: PM:9087440
- Katahira, J.; Sugiyama, H.; Inoue, N.; Horiguchi, Y.; Matsuda, M. und Sugimoto, N. (1997b): *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo, *J.Biol.Chem.* (Band 272), Nr. 42, Seite 26652-26658. URL: PM:9334247
- Kausalya, P. J.; Amasheh, S.; Gunzel, D.; Wurps, H.; Muller, D.; Fromm, M. und Hunziker, W. (2006): Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg<sup>2+</sup> transport function of Claudin-16, *J.Clin.Invest* (Band 116), Nr. 4, Seite 878-891. URL: PM:16528408
- Kim, S. K. (1995): Tight junctions, membrane-associated guanylate kinases and cell signaling, *Curr.Opin.Cell Biol.* (Band 7), Nr. 5, Seite 641-649. URL: PM:8573338
- Kiuchi-Saishin, Y.; Gotoh, S.; Furuse, M.; Takasuga, A.; Tano, Y. und Tsukita, S. (2002): Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments, *J.Am.Soc.Nephrol.* (Band 13), Nr. 4, Seite 875-886. URL: PM:11912246
- Kokai-Kun, J. F.; Benton, K.; Wieckowski, E. U. und McClane, B. A. (1999): Identification of a *Clostridium perfringens* enterotoxin region required for large complex formation and cytotoxicity by random mutagenesis, *Infect.Immun.* (Band 67), Nr. 11, Seite 5634-5641. URL: PM:10531210
- Kokai-Kun, J. F. und McClane, B. A. (1997): Deletion analysis of the *Clostridium perfringens* enterotoxin, *Infect.Immun.* (Band 65), Nr. 3, Seite 1014-1022. URL: PM:9038311
- Kominsky, S. L.; Argani, P.; Korz, D.; Evron, E.; Raman, V.; Garrett, E.; Rein, A.; Sauter, G.; Kallioniemi, O. P. und Sukumar, S. (2003): Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with

- histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast, *Oncogene* (Band 22), Nr. 13, Seite 2021-2033. URL: PM:12673207
- Kominsky, S. L.; Tyler, B.; Sosnowski, J.; Brady, K.; Doucet, M.; Nell, D.; Smedley, J. G., III; McClane, B.; Brem, H. und Sukumar, S. (2007): Clostridium perfringens enterotoxin as a novel-targeted therapeutic for brain metastasis, *Cancer Res.* (Band 67), Nr. 17, Seite 7977-7982. URL: PM:17804705
- Kominsky, S. L.; Vali, M.; Korz, D.; Gabig, T. G.; Weitzman, S. A.; Argani, P. und Sukumar, S. (2004): Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4, *Am.J.Pathol.* (Band 164), Nr. 5, Seite 1627-1633. URL: PM:15111309
- Kondoh, M.; Takahashi, A.; Fujii, M.; Yagi, K. und Watanabe, Y. (2006): A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator, *Biol.Pharm.Bull.* (Band 29), Nr. 9, Seite 1783-1789. URL: PM:16946486
- Konrad, M.; Schaller, A.; Seelow, D.; Pandey, A. V.; Waldegger, S.; Lesslauer, A.; Vitzthum, H.; Suzuki, Y.; Luk, J. M.; Becker, C.; Schlingmann, K. P.; Schmid, M.; Rodriguez-Soriano, J.; Ariceta, G.; Cano, F.; Enriquez, R.; Juppner, H.; Bakaloglu, S. A.; Hediger, M. A.; Gallati, S.; Neuhaus, S. C.; Nurnberg, P. und Weber, S. (2006): Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement, *Am.J.Hum.Genet.* (Band 79), Nr. 5, Seite 949-957. URL: PM:17033971
- Kostrewa, D.; Brockhaus, M.; D'Arcy, A.; Dale, G. E.; Nelboeck, P.; Schmid, G.; Mueller, F.; Bazzoni, G.; Dejana, E.; Bartfai, T.; Winkler, F. K. und Hennig, M. (2001): X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif, *EMBO J.* (Band 20), Nr. 16, Seite 4391-4398. URL: PM:11500366
- Koto, T.; Takubo, K.; Ishida, S.; Shinoda, H.; Inoue, M.; Tsubota, K.; Okada, Y. und Ikeda, E. (2007): Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells, *Am.J.Pathol.* (Band 170), Nr. 4, Seite 1389-1397. URL: PM:17392177
- Krause, G.; Winkler, L.; Mueller, S. L.; Haseloff, R. F.; Piontek, J. und Blasig, I. E. (2008): Structure and function of claudins, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 631-645. URL: PM:18036336
- Kroll, R. A. und Neuwelt, E. A. (1998): Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means, *Neurosurgery* (Band 42), Nr. 5, Seite 1083-1099. URL: PM:9588554
- Laukoetter, M. G.; Nava, P.; Lee, W. Y.; Severson, E. A.; Capaldo, C. T.; Babbin, B. A.; Williams, I. R.; Koval, M.; Peatman, E.; Campbell, J. A.; Dermody, T. S.; Nusrat, A. und Parkos, C. A. (2007): JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo, *J.Exp.Med.* (Band 204), Nr. 13, Seite 3067-3076. URL: PM:18039951
- Lee, D. B.; Huang, E. und Ward, H. J. (2006): Tight junction biology and kidney dysfunction, *Am.J.Physiol Renal Physiol* (Band 290), Nr. 1, Seite F20-F34. URL: PM:16339962
- Li, W. Y.; Huey, C. L. und Yu, A. S. (2004): Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron, *Am.J.Physiol Renal Physiol* (Band 286), Nr. 6, Seite F1063-F1071. URL: PM:14722018
- Liebner, S.; Fischmann, A.; Rascher, G.; Duffner, F.; Grote, E. H.; Kalbacher, H. und Wolburg, H. (2000a): Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme, *Acta Neuropathol.* (Band 100), Nr. 3, Seite 323-331. URL: PM:10965803
- Liebner, S.; Kniessel, U.; Kalbacher, H. und Wolburg, H. (2000b): Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells, *Eur.J.Cell Biol.* (Band 79), Nr. 10, Seite 707-717. URL: PM:11089919
- LINDEMANN, B. und SOLOMON, A. K. (1962): Permeability of luminal surface of intestinal mucosal cells, *J.Gen.Physiol* (Band 45), Seite 801-810. URL: PM:14465429



- Lindmark, T.; Kimura, Y. und Artursson, P. (1998): Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* (Band 284), Nr. 1, Seite 362-369. URL: PM:9435199
- Ling, J.; Liao, H.; Clark, R.; Wong, M. S. und Lo, D. D. (2008): Structural constraints for the binding of short peptides to claudin-4 revealed by surface plasmon resonance, *J.Biol.Chem.* URL: PM:18782762
- Litkouhi, B.; Kwong, J.; Lo, C. M.; Smedley, J. G., III; McClane, B. A.; Aponte, M.; Gao, Z.; Sarno, J. L.; Hinnens, J.; Welch, W. R.; Berkowitz, R. S.; Mok, S. C. und Garner, E. I. (2007): Claudin-4 overexpression in epithelial ovarian cancer is associated with hypomethylation and is a potential target for modulation of tight junction barrier function using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, *Neoplasia*. (Band 9), Nr. 4, Seite 304-314. URL: PM:17460774
- Liu, L. B.; Xue, Y. X.; Liu, Y. H. und Wang, Y. B. (2008): Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton, *J.Neurosci.Res.* (Band 86), Nr. 5, Seite 1153-1168. URL: PM:18183615
- Liu, Y.; Nusrat, A.; Schnell, F. J.; Reaves, T. A.; Walsh, S.; Pochet, M. und Parkos, C. A. (2000): Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia, *J.Cell Sci.* (Band 113 ( Pt 13)), Seite 2363-2374. URL: PM:10852816
- Lo, C. M.; Keese, C. R. und Giaever, I. (1999): Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters, *Exp.Cell Res.* (Band 250), Nr. 2, Seite 576-580. URL: PM:10413610
- Long, H.; Crean, C. D.; Lee, W. H.; Cummings, O. W. und Gabig, T. G. (2001): Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium, *Cancer Res.* (Band 61), Nr. 21, Seite 7878-7881. URL: PM:11691807
- Mack, A. F. und Wolburg, H. (2006): Growing axons in fish optic nerve are accompanied by astrocytes interconnected by tight junctions, *Brain Res.* (Band 1103), Nr. 1, Seite 25-31. URL: PM:16814265
- Macklin, C. C. und Macklin, M. T. (1926): Is the Mingazzini Phenomenon, in the Villus of the Small Intestine, an Evidence of Absorption?, *J.Anat.* (Band 61), Nr. Pt 1, Seite 144-150. URL: PM:17104125
- Mandell, K. J.; McCall, I. C. und Parkos, C. A. (2004): Involvement of the junctional adhesion molecule-1 (JAM1) homodimer interface in regulation of epithelial barrier function, *J.Biol.Chem.* (Band 279), Nr. 16, Seite 16254-16262. URL: PM:14749337
- Martin-Padura, I.; Lostaglio, S.; Schneemann, M.; Williams, L.; Romano, M.; Fruscella, P.; Panzeri, C.; Stoppacciaro, A.; Ruco, L.; Villa, A.; Simmons, D. und Dejana, E. (1998): Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration, *J.Cell Biol.* (Band 142), Nr. 1, Seite 117-127. URL: PM:9660867
- Masuyama, A.; Kondoh, M.; Seguchi, H.; Takahashi, A.; Harada, M.; Fujii, M.; Mizuguchi, H.; Horiguchi, Y. und Watanabe, Y. (2005): Role of N-terminal amino acids in the absorption-enhancing effects of the c-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* (Band 314), Nr. 2, Seite 789-795. URL: PM:15870390
- McCarthy, K. M.; Francis, S. A.; McCormack, J. M.; Lai, J.; Rogers, R. A.; Skare, I. B.; Lynch, R. D. und Schneeberger, E. E. (2000): Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells, *J.Cell Sci.* (Band 113 Pt 19), Seite 3387-3398. URL: PM:10984430
- McCarthy, K. M.; Skare, I. B.; Stankewich, M. C.; Furuse, M.; Tsukita, S.; Rogers, R. A.; Lynch, R. D. und Schneeberger, E. E. (1996): Occludin is a functional component of the tight junction, *J.Cell Sci.* (Band 109 ( Pt 9)), Seite 2287-2298. URL: PM:8886979
- McClane, B. A.; Hanna, P. C. und Wnek, A. P. (1988): *Clostridium perfringens* enterotoxin, *Microb.Pathog.* (Band 4), Nr. 5, Seite 317-323. URL: PM:2907364

- McClane, B. A. und McDonel, J. L. (1979): The effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on morphology, viability, and macromolecular synthesis in Vero cells, *J.Cell Physiol* (Band 99), Nr. 2, Seite 191-200. URL: PM:222780
- McCoy, M. H. und Wang, E. (2005): Use of electric cell-substrate impedance sensing as a tool for quantifying cytopathic effect in influenza A virus infected MDCK cells in real-time, *J.Virol.Methods* (Band 130), Nr. 1-2, Seite 157-161. URL: PM:16095727
- McNeil, E.; Capaldo, C. T. und Macara, I. G. (2006): Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells, *Mol.Biol.Cell* (Band 17), Nr. 4, Seite 1922-1932. URL: PM:16436508
- Medina, R.; Rahner, C.; Mitic, L. L.; Anderson, J. M. und Van Itallie, C. M. (2000): Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop, *J.Membr.Biol.* (Band 178), Nr. 3, Seite 235-247. URL: PM:11140279
- Meertens, L.; Bertaux, C.; Cukierman, L.; Cormier, E.; Lavillette, D.; Cosset, F. L. und Dragic, T. (2008): The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus, *J.Virol.* (Band 82), Nr. 7, Seite 3555-3560. URL: PM:18234789
- Mehta, D. und Malik, A. B. (2006): Signaling mechanisms regulating endothelial permeability, *Physiol Rev.* (Band 86), Nr. 1, Seite 279-367. URL: PM:16371600
- Miller, J. K. und Slive, A. (2004): Breaking down the barriers to clinical service delivery: walk-in family therapy, *J.Marital Fam.Ther.* (Band 30), Nr. 1, Seite 95-103. URL: PM:14763212
- Miwa, N.; Furuse, M.; Tsukita, S.; Niikawa, N.; Nakamura, Y. und Furukawa, Y. (2001): Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers, *Oncol.Res.* (Band 12), Nr. 11-12, Seite 469-476. URL: PM:11939410
- Miyamoto, K.; Kusumi, T.; Sato, F.; Kawasaki, H.; Shibata, S.; Ohashi, M.; Hakamada, K.; Sasaki, M. und Kijima, H. (2008): Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma, *Biomed.Res.* (Band 29), Nr. 2, Seite 71-76. URL: PM:18480547
- Miyamoto, T.; Morita, K.; Takemoto, D.; Takeuchi, K.; Kitano, Y.; Miyakawa, T.; Nakayama, K.; Okamura, Y.; Sasaki, H.; Miyachi, Y.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2005): Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice, *J.Cell Biol.* (Band 169), Nr. 3, Seite 527-538. URL: PM:15883201
- Morita, K.; Furuse, M.; Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1999a): Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 96), Nr. 2, Seite 511-516. URL: PM:9892664
- Morita, K.; Sasaki, H.; Furuse, M. und Tsukita, S. (1999b): Endothelial claudin: claudin-5/TMVCFC constitutes tight junction strands in endothelial cells, *J.Cell Biol.* (Band 147), Nr. 1, Seite 185-194. URL: PM:10508865
- Mrsny, R. J.; Brown, G. T.; Gerner-Smidt, K.; Buret, A. G.; Meddings, J. B.; Quan, C.; Koval, M. und Nusrat, A. (2008): A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity, *Am.J.Pathol.* (Band 172), Nr. 4, Seite 905-915. URL: PM:18349130
- Muhleisen, H.; Wolburg, H. und Betz, E. (1989): Freeze-fracture analysis of endothelial cell membranes in rabbit carotid arteries subjected to short-term atherogenic stimuli, *Virchows Arch.B Cell Pathol.Incl.Mol.Pathol.* (Band 56), Nr. 6, Seite 413-417. URL: PM:2567090
- Muller, D.; Kausalya, P. J.; Claverie-Martin, F.; Meij, I. C.; Eggert, P.; Garcia-Nieto, V. und Hunziker, W. (2003): A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting, *Am.J.Hum.Genet.* (Band 73), Nr. 6, Seite 1293-1301. URL: PM:14628289
- Naik, M. U.; Mousa, S. A.; Parkos, C. A. und Naik, U. P. (2003): Signaling through JAM-1 and  $\alpha$ v $\beta$ 3 is required for the angiogenic action of bFGF: dissociation of the JAM-1 and  $\alpha$ v $\beta$ 3 complex, *Blood* (Band 102), Nr. 6, Seite 2108-2114. URL: PM:12750158

- Neuwelt, E. A.; Frenkel, E. P.; Diehl, J.; Vu, L. H.; Rapoport, S. und Hill, S. (1980): Reversible osmotic blood-brain barrier disruption in humans: implications for the chemotherapy of malignant brain tumors, *Neurosurgery* (Band 7), Nr. 1, Seite 44-52. URL: PM:6251399
- Neuwelt, E. A.; Maravilla, K. R.; Frenkel, E. P.; Rapoport, S. I.; Hill, S. A. und Barnett, P. A. (1979): Osmotic blood-brain barrier disruption. Computerized tomographic monitoring of chemotherapeutic agent delivery, *J.Clin.Invest* (Band 64), Nr. 2, Seite 684-688. URL: PM:457877
- Nichols, L. S.; Ashfaq, R. und Iacobuzio-Donahue, C. A. (2004): Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target, *Am.J.Clin.Pathol.* (Band 121), Nr. 2, Seite 226-230. URL: PM:14983936
- Nitta, T.; Hata, M.; Gotoh, S.; Seo, Y.; Sasaki, H.; Hashimoto, N.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2003): Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice, *J.Cell Biol.* (Band 161), Nr. 3, Seite 653-660. URL: PM:12743111
- Nunbhakdi-Craig, V.; Machleidt, T.; Ogris, E.; Bellotto, D.; White, C. L., III und Sontag, E. (2002): Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex, *J.Cell Biol.* (Band 158), Nr. 5, Seite 967-978. URL: PM:12196510
- Nunes, F. D.; Lopez, L. N.; Lin, H. W.; Davies, C.; Azevedo, R. B.; Gow, A. und Kachar, B. (2006): Distinct subdomain organization and molecular composition of a tight junction with adherens junction features, *J.Cell Sci.* (Band 119), Nr. Pt 23, Seite 4819-4827. URL: PM:17130295
- Nusrat, A.; Brown, G. T.; Tom, J.; Drake, A.; Bui, T. T.; Quan, C. und Mrsny, R. J. (2005): Multiple protein interactions involving proposed extracellular loop domains of the tight junction protein occludin, *Mol.Biol.Cell* (Band 16), Nr. 4, Seite 1725-1734. URL: PM:15659655
- O'goshi, K. und Serup, J. (2006): Safety of sodium fluorescein for in vivo study of skin, *Skin Res.Technol.* (Band 12), Nr. 3, Seite 155-161. URL: PM:16827689
- Ohtsuki, S.; Sato, S.; Yamaguchi, H.; Kamoi, M.; Asashima, T. und Terasaki, T. (2007): Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells, *J.Cell Physiol* (Band 210), Nr. 1, Seite 81-86. URL: PM:16998798
- Pardridge, W. M. (2005): The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development, *NeuroRx.* (Band 2), Nr. 1, Seite 3-14. URL: PM:15717053
- Piontek, J.; Winkler, L.; Wolburg, H.; Muller, S. L.; Zuleger, N.; Piehl, C.; Wiesner, B.; Krause, G. und Blasig, I. E. (2008): Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins, *FASEB J.* (Band 22), Nr. 1, Seite 146-158. URL: PM:17761522
- Pitelka, D. R.; Taggart, B. N. und Hamamoto, S. T. (1983): Effects of extracellular calcium depletion on membrane topography and occluding junctions of mammary epithelial cells in culture, *J.Cell Biol.* (Band 96), Nr. 3, Seite 613-624. URL: PM:6403552
- Powell, D. W. (1981): Barrier function of epithelia, *Am.J.Physiol* (Band 241), Nr. 4, Seite G275-G288. URL: [PM:7032321](#)
- Praga, M.; Vara, J.; Gonzalez-Parra, E.; Andres, A.; Alamo, C.; Araque, A.; Ortiz, A. und Rodicio, J. L. (1995): Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis, *Kidney Int.* (Band 47), Nr. 5, Seite 1419-1425. URL: PM:7637271
- Rahner, C.; Mitic, L. L. und Anderson, J. M. (2001): Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut, *Gastroenterology* (Band 120), Nr. 2, Seite 411-422. URL: PM:11159882
- Rajasekaran, S. A.; Beyenbach, K. W. und Rajasekaran, A. K. (2008): Interactions of tight junctions with membrane channels and transporters, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1778), Nr. 3, Seite 757-769. URL: PM:18086552
- Rangel, L. B.; Agarwal, R.; D'Souza, T.; Pizer, E. S.; Alo, P. L.; Lancaster, W. D.; Gregoire, L.; Schwartz, D. R.; Cho, K. R. und Morin, P. J. (2003): Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas, *Clin.Cancer Res.* (Band 9), Nr. 7, Seite 2567-2575. URL: PM:12855632

- Rapoport, S. I.; Fredericks, W. R.; Ohno, K. und Pettigrew, K. D. (1980): Quantitative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier, *Am.J.Physiol* (Band 238), Nr. 5, Seite R421-R431. URL: PM:7377381
- Reddy, G. L.; Iwamoto, T.; Tomich, J. M. und Montal, M. (1993): Synthetic peptides and four-helix bundle proteins as model systems for the pore-forming structure of channel proteins. II. Transmembrane segment M2 of the brain glycine receptor is a plausible candidate for the pore-lining structure, *J.Biol.Chem.* (Band 268), Nr. 20, Seite 14608-14615. URL: PM:7686901
- Reese, T. S. und Karnovsky, M. J. (1967): Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase, *J.Cell Biol.* (Band 34), Nr. 1, Seite 207-217. URL: PM:6033532
- Reid, L. (1976): Sputum and mucociliary clearance mechanisms, *Postgrad.Med.J.* (Band 52), Nr. 606, Seite 183-189. URL: PM:775476
- Rendon-Huerta, E.; Valenzano, M. C.; Mullin, J. M.; Trembeth, S. E.; Kothari, R.; Hameed, B.; Mercogliano, G. und Thornton, J. J. (2003): Comparison of three integral tight junction barrier proteins in Barrett's epithelium versus normal esophageal epithelium, *Am.J.Gastroenterol.* (Band 98), Nr. 8, Seite 1901-1903. URL: PM:12907361
- Riazuddin, S.; Ahmed, Z. M.; Fanning, A. S.; Lagziel, A.; Kitajiri, S.; Ramzan, K.; Khan, S. N.; Chattaraj, P.; Friedman, P. L.; Anderson, J. M.; Belyantseva, I. A.; Forge, A.; Riazuddin, S. und Friedman, T. B. (2006): Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing, *Am.J.Hum.Genet.* (Band 79), Nr. 6, Seite 1040-1051. URL: PM:17186462
- Ruffer, C. und Gerke, V. (2004): The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions, *Eur.J.Cell Biol.* (Band 83), Nr. 4, Seite 135-144. URL: PM:15260435
- Saitou, M.; Fujimoto, K.; Doi, Y.; Itoh, M.; Fujimoto, T.; Furuse, M.; Takano, H.; Noda, T. und Tsukita, S. (1998): Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions, *J.Cell Biol.* (Band 141), Nr. 2, Seite 397-408. URL: PM:9548718
- Saitou, M.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Schulzke, J. D.; Fromm, M.; Takano, H.; Noda, T. und Tsukita, S. (2000): Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands, *Mol.Biol.Cell* (Band 11), Nr. 12, Seite 4131-4142. URL: PM:11102513
- Sanovich, E.; Bartus, R. T.; Friden, P. M.; Dean, R. L.; Le, H. Q. und Brightman, M. W. (1995): Pathway across blood-brain barrier opened by the bradykinin agonist, RMP-7, *Brain Res.* (Band 705), Nr. 1-2, Seite 125-135. URL: PM:8821743
- Santin, A. D.; Bellone, S.; Siegel, E. R.; McKenney, J. K.; Thomas, M.; Roman, J. J.; Burnett, A.; Tognon, G.; Bandiera, E. und Pecorelli, S. (2007): Overexpression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in uterine carcinosarcomas, *Clin.Cancer Res.* (Band 13), Nr. 11, Seite 3339-3346. URL: PM:17545541
- Sas, D.; Hu, M.; Moe, O. W. und Baum, M. (2008): Effect of claudins 6 and 9 on paracellular permeability in MDCK II cells, *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* (Band 295), Nr. 5, Seite R1713-R1719. URL: PM:18784328
- Sato, N.; Fukushima, N.; Maitra, A.; Iacobuzio-Donahue, C. A.; van Heek, N. T.; Cameron, J. L.; Yeo, C. J.; Hruban, R. H. und Goggins, M. (2004): Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas, *Am.J.Pathol.* (Band 164), Nr. 3, Seite 903-914. URL: PM:14982844
- Sawada, T.; Ogawa, T.; Tomita, M.; Hayashi, M. und Awazu, S. (1991): Role of paracellular pathway in nonelectrolyte permeation across rat colon epithelium enhanced by sodium caprate and sodium caprylate, *Pharm.Res.* (Band 8), Nr. 11, Seite 1365-1371. URL: PM:1798671
- Schneeberger, E. E. und Lynch, R. D. (2004): The tight junction: a multifunctional complex, *Am.J.Physiol Cell Physiol* (Band 286), Nr. 6, Seite C1213-C1228. URL: PM:15151915
- Schreibelt, G.; Kooij, G.; Reijerkerk, A.; van Doorn, R.; Gringhuis, S. I.; van der, Pol S.; Weksler, B. B.; Romero, I. A.; Couraud, P. O.; Piontek, J.; Blasig, I. E.; Dijkstra, C. D.; Ronken, E. und de Vries, H. E. (2007): Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling, *FASEB J.* URL: PM:17586731

- Sheehan, G. M.; Kallakury, B. V.; Sheehan, C. E.; Fisher, H. A.; Kaufman, R. P., Jr. und Ross, J. S. (2007): Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas, *Hum.Pathol.* (Band 38), Nr. 4, Seite 564-569. URL: PM:17306334
- Sheth, P.; Delos, Santos N.; Seth, A.; LaRusso, N. F. und Rao, R. K. (2007): Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBP-dependent mechanism, *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* (Band 293), Nr. 1, Seite G308-G318. URL: PM:17446308
- SIDEL, V. W. und SOLOMON, A. K. (1957): Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient, *J.Gen.Physiol* (Band 41), Nr. 2, Seite 243-257. URL: PM:13475689
- Siegal, T.; Rubinstein, R.; Bokstein, F.; Schwartz, A.; Lossos, A.; Shalom, E.; Chisin, R. und Gormori, J. M. (2000): In vivo assessment of the window of barrier opening after osmotic blood-brain barrier disruption in humans, *J.Neurosurg.* (Band 92), Nr. 4, Seite 599-605. URL: PM:10761648
- Simionescu, M.; Simionescu, N. und PALADE, G. E. (1976): Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins, *J.Cell Biol.* (Band 68), Nr. 3, Seite 705-723. URL: PM:1030708
- Simon, D. B.; Lu, Y.; Choate, K. A.; Velazquez, H.; Al Sabban, E.; Praga, M.; Casari, G.; Bettinelli, A.; Colussi, G.; Rodriguez-Soriano, J.; McCredie, D.; Milford, D.; Sanjad, S. und Lifton, R. P. (1999): Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption, *Science* (Band 285), Nr. 5424, Seite 103-106. URL: PM:10390358
- Smedley, J. G., III und McClane, B. A. (2004): Fine mapping of the N-terminal cytotoxicity region of *Clostridium perfringens* enterotoxin by site-directed mutagenesis, *Infect.Immun.* (Band 72), Nr. 12, Seite 6914-6923. URL: PM:15557612
- Smyth, D. H. (1968): The intestinal epithelial cell, *Ulster Med.J.* (Band 37), Nr. 2, Seite 107-125. URL: PM:5700236
- Soma, T.; Chiba, H.; Kato-Mori, Y.; Wada, T.; Yamashita, T.; Kojima, T. und Sawada, N. (2004): Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP, *Exp.Cell Res.* (Band 300), Nr. 1, Seite 202-212. URL: PM:15383327
- Sonoda, N.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Yonemura, S.; Katahira, J.; Horiguchi, Y. und Tsukita, S. (1999): *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier, *J.Cell Biol.* (Band 147), Nr. 1, Seite 195-204. URL: PM:10508866
- Spring, K. R. (1998): Routes and mechanism of fluid transport by epithelia, *Annu.Rev.Physiol* (Band 60), Seite 105-119. URL: PM:9558456
- Staehelin, L. A. (1973): Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions, *J.Cell Sci.* (Band 13), Nr. 3, Seite 763-786. URL: PM:4203962
- Staehelin, L. A. (1974): Structure and function of intercellular junctions, *Int.Rev.Cytol.* (Band 39), Seite 191-283. URL: PM:4611943
- Stevenson, B. R.; Anderson, J. M.; Goodenough, D. A. und Mooseker, M. S. (1988): Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance, *J.Cell Biol.* (Band 107), Nr. 6 Pt 1, Seite 2401-2408. URL: PM:3058723
- Stevenson, B. R.; Siliciano, J. D.; Mooseker, M. S. und Goodenough, D. A. (1986): Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia, *J.Cell Biol.* (Band 103), Nr. 3, Seite 755-766. URL: PM:3528172
- Suzuki, T. und Hara, H. (2006): Difuctose anhydride III and sodium caprate activate paracellular transport via different intracellular events in Caco-2 cells, *Life Sci.* (Band 79), Nr. 4, Seite 401-410. URL: PM:16566947
- Takahashi, A.; Kondoh, M.; Masuyama, A.; Fujii, M.; Mizuguchi, H.; Horiguchi, Y. und Watanabe, Y. (2005): Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* entero-

- toxin in its interaction with claudin-4, *J.Control Release* (Band 108), Nr. 1, Seite 56-62. URL: PM:16091298
- Tanaka, M.; Kamata, R. und Sakai, R. (2005): EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability, *J.Biol.Chem.* (Band 280), Nr. 51, Seite 42375-42382. URL: PM:16236711
- THOMSON, M. L. (1955): Relative efficiency of pigment and horny layer thickness in protecting the skin of Europeans and Africans against solar ultraviolet radiation, *J.Physiol* (Band 127), Nr. 2, Seite 236-246. URL: PM:14354667
- Tiruppathi, C.; Malik, A. B.; Del Vecchio, P. J.; Keese, C. R. und Giaever, I. (1992): Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 89), Nr. 17, Seite 7919-7923. URL: PM:1518814
- Tokes, A. M.; Kulka, J.; Paku, S.; Szik, A.; Paska, C.; Novak, P. K.; Szilak, L.; Kiss, A.; Bogi, K. und Schaff, Z. (2005): Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study, *Breast Cancer Res.* (Band 7), Nr. 2, Seite R296-R305. URL: PM:15743508
- Tomita, M.; Hayashi, M. und Awazu, S. (1995): Absorption-enhancing mechanism of sodium caprate and decanoylcarnitine in Caco-2 cells, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* (Band 272), Nr. 2, Seite 739-743. URL: PM:7853188
- Tsukita, S. und Furuse, M. (2000): Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores, *J.Cell Biol.* (Band 149), Nr. 1, Seite 13-16. URL: PM:10747082
- Tsukita, S.; Furuse, M. und Itoh, M. (2001): Multifunctional strands in tight junctions, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* (Band 2), Nr. 4, Seite 285-293. URL: PM:11283726
- Turksen, K. und Troy, T. C. (2001): Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium, *Dev.Dyn.* (Band 222), Nr. 2, Seite 292-300. URL: PM:11668606
- Turksen, K. und Troy, T. C. (2004): Barriers built on claudins, *J.Cell Sci.* (Band 117), Nr. Pt 12, Seite 2435-2447. URL: PM:15159449
- Tzelepi, V. N.; Tsamandas, A. C.; Vlotinou, H. D.; Vagianos, C. E. und Scopa, C. D. (2008): Tight junctions in thyroid carcinogenesis: diverse expression of claudin-1, claudin-4, claudin-7 and occludin in thyroid neoplasms, *Mod.Pathol.* (Band 21), Nr. 1, Seite 22-30. URL: PM:17962811
- Umeda, K.; Ikenouchi, J.; Katahira-Tayama, S.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Nakayama, M.; Matsui, T.; Tsukita, S.; Furuse, M. und Tsukita, S. (2006): ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation, *Cell* (Band 126), Nr. 4, Seite 741-754. URL: PM:16923393
- Uteperbergenov, D. I.; Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (2006): Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain, *J.Biol.Chem.* (Band 281), Nr. 34, Seite 24671-24677. URL: PM:16790439
- Valentich, J. D. (1981): Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting tubule, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (Band 372), Seite 384-405. URL: PM:6951420
- van Deurs, B. und Koehler, J. K. (1979): Tight junctions in the choroid plexus epithelium. A freeze-fracture study including complementary replicas, *J.Cell Biol.* (Band 80), Nr. 3, Seite 662-673. URL: PM:457764
- Van Itallie, C.; Rahner, C. und Anderson, J. M. (2001): Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability, *J.Clin.Invest* (Band 107), Nr. 10, Seite 1319-1327. URL: PM:11375422
- Van Itallie, C. M. und Anderson, J. M. (2006a): Claudins and epithelial paracellular transport, *Annu.Rev.Physiol* (Band 68), Seite 403-429. URL: PM:16460278
- Van Itallie, C. M.; Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (2003): Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins, *Am.J.Physiol Renal Physiol* (Band 285), Nr. 6, Seite F1078-F1084. URL: PM:13129853

- Van Itallie, C. M.; Holmes, J.; Bridges, A.; Gookin, J. L.; Coccaro, M. R.; Proctor, W.; Colegio, O. R. und Anderson, J. M. (2008): The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2, *J.Cell Sci.* (Band 121), Nr. Pt 3, Seite 298-305. URL: PM:18198187
- Van Itallie, C. M.; Rogan, S.; Yu, A.; Vidal, L. S.; Holmes, J. und Anderson, J. M. (2006b): Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities, *Am.J.Physiol Renal Physiol* (Band 291), Nr. 6, Seite F1288-F1299. URL: PM:16804102
- van Meer, G. und Simons, K. (1986): The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells, *EMBO J.* (Band 5), Nr. 7, Seite 1455-1464. URL: PM:3743548
- Volpe, D. A. (2008): Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays, *J.Pharm.Sci.* (Band 97), Nr. 2, Seite 712-725. URL: PM:17542022
- Vorbrodt, A. W. und Dobrogowska, D. H. (2004): Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels, *Folia Histochem.Cytobiol.* (Band 42), Nr. 2, Seite 67-75. URL: PM:15253128
- Vovis, G. F. und Lacks, S. (1977): Complementary action of restriction enzymes endo R-DpnI and Endo R-DpnII on bacteriophage f1 DNA, *J.Mol.Biol.* (Band 115), Nr. 3, Seite 525-538. URL: PM:592372
- Walters, R. W.; Freimuth, P.; Moninger, T. O.; Ganske, I.; Zabner, J. und Welsh, M. J. (2002): Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape, *Cell* (Band 110), Nr. 6, Seite 789-799. URL: PM:12297051
- Waterston, D. (1933): Observations on sensation: The sensory functions of the skin for touch and pain, *J.Physiol* (Band 77), Nr. 3, Seite 251-257. URL: PM:16994388
- Wattenhofer, M.; Reymond, A.; Falcicola, V.; Charollais, A.; Caille, D.; Borel, C.; Lyle, R.; Estivill, X.; Petersen, M. B.; Meda, P. und Antonarakis, S. E. (2005): Different mechanisms preclude mutant CLDN14 proteins from forming tight junctions in vitro, *Hum.Mutat.* (Band 25), Nr. 6, Seite 543-549. URL: PM:15880785
- Weber, S.; Schneider, L.; Peters, M.; Misselwitz, J.; Ronnefarth, G.; Boswald, M.; Bonzel, K. E.; Seeman, T.; Sulakova, T.; Kuwertz-Broking, E.; Gregoric, A.; Palcoux, J. B.; Tasic, V.; Manz, F.; Scharer, K.; Seyberth, H. W. und Konrad, M. (2001): Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis, *J.Am.Soc.Nephrol.* (Band 12), Nr. 9, Seite 1872-1881. URL: PM:11518780
- Wegener, J.; Keese, C. R. und Giaever, I. (2000): Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces, *Exp.Cell Res.* (Band 259), Nr. 1, Seite 158-166. URL: PM:10942588
- WEINTRAUB, L. R.; DEMIS, D. J.; CONRAD, M. E. und CROSBY, W. H. (1965): IRON EXCRETION BY THE SKIN. SELECTIVE LOCALIZATION OF IRON-59 IN EPITHELIAL CELLS, *Am.J.Pathol.* (Band 46), Seite 121-127. URL: PM:14253125
- Weksler, B. B.; Subileau, E. A.; Perriere, N.; Charneau, P.; Holloway, K.; Leveque, M.; Tricoire-Leignel, H.; Nicotra, A.; Bourdoulous, S.; Turowski, P.; Male, D. K.; Roux, F.; Greenwood, J.; Romero, I. A. und Couraud, P. O. (2005): Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line, *FASEB J.* (Band 19), Nr. 13, Seite 1872-1874. URL: PM:16141364
- Wen, H.; Watry, D. D.; Marcondes, M. C. und Fox, H. S. (2004): Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5, *Mol.Cell Biol.* (Band 24), Nr. 19, Seite 8408-8417. URL: PM:15367662
- Wilcox, E. R.; Burton, Q. L.; Naz, S.; Riazuddin, S.; Smith, T. N.; Ploplis, B.; Belyantseva, I.; Ben Yosef, T.; Liburd, N. A.; Morell, R. J.; Kachar, B.; Wu, D. K.; Griffith, A. J.; Riazuddin, S. und Friedman, T. B. (2001): Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29, *Cell* (Band 104), Nr. 1, Seite 165-172. URL: PM:11163249
- Willott, E.; Balda, M. S.; Fanning, A. S.; Jameson, B.; Van Itallie, C. und Anderson, J. M. (1993): The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor

- protein of septate junctions, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 90), Nr. 16, Seite 7834-7838. URL: PM:8395056
- Wittchen, E. S.; Haskins, J. und Stevenson, B. R. (1999): Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3, *J.Biol.Chem.* (Band 274), Nr. 49, Seite 35179-35185. URL: PM:10575001
- Wolburg, H. und Lippoldt, A. (2002): Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation, *Vascul.Pharmacol.* (Band 38), Nr. 6, Seite 323-337. URL: PM:12529927
- Wolburg, H.; Wolburg-Buchholz, K.; Kraus, J.; Rascher-Eggstein, G.; Liebner, S.; Hamm, S.; Duffner, F.; Grote, E. H.; Risau, W. und Engelhardt, B. (2003): Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme, *Acta Neuropathol.* (Band 105), Nr. 6, Seite 586-592. URL: PM:12734665
- Wong, V. und Gumbiner, B. M. (1997): A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier, *J.Cell Biol.* (Band 136), Nr. 2, Seite 399-409. URL: PM:9015310
- Woods, D. F. und Bryant, P. J. (1993): ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions, *Mech.Dev.* (Band 44), Nr. 2-3, Seite 85-89. URL: PM:8155583
- Yamauchi, K.; Rai, T.; Kobayashi, K.; Sohara, E.; Suzuki, T.; Itoh, T.; Suda, S.; Hayama, A.; Sasaki, S. und Uchida, S. (2004): Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 101), Nr. 13, Seite 4690-4694. URL: PM:15070779
- Yu, A. S.; Enck, A. H.; Lencer, W. I. und Schneeberger, E. E. (2003): Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation, *J.Biol.Chem.* (Band 278), Nr. 19, Seite 17350-17359. URL: PM:12615928
- Zeissig, S.; Burgel, N.; Gunzel, D.; Richter, J.; Mankertz, J.; Wahnschaffe, U.; Kroesen, A. J.; Zeitz, M.; Fromm, M. und Schulzke, J. D. (2007): Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease, *Gut* (Band 56), Nr. 1, Seite 61-72. URL: PM:16822808



## Anhang

**Tabelle S22: TER-Werte der FLAG-Cld5 stabil exprimierenden MDCK-II-Zellen**

FLAG-Cld5-Protein	TER ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , MW $\pm$ SEM)
Vektorkontrolle	105 $\pm$ 3,6
Cld5 <sub>wt</sub>	507 $\pm$ 42***
Cld5 <sub>R145A</sub>	152 $\pm$ 10
Cld5 <sub>Y148A</sub>	107 $\pm$ 5,2
Cld5 <sub>K157A</sub>	113 $\pm$ 4,6
Cld5 <sub>Y158A</sub>	80 $\pm$ 7
Cld5 <sub>E159Q</sub>	152 $\pm$ 11,9

Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\*\*  $p < 0,0001$  im Vergleich zur Vektorkontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n \geq 10$ .

**Tabelle S23:  $P_{\text{coeff}}$  (FDS) der FLAG-Cld5 exprimierenden MDCK-II-Zellen**

FLAG-Cld5-Protein	$P_{\text{coeff}}$ (FDS) (cm/s, MW $\pm$ SEM)
Vektorkontrolle	$3,38 \cdot 10^{-6} \pm 2,14 \cdot 10^{-7}$
Cld5 <sub>wt</sub>	$1,52 \cdot 10^{-6} \pm 9,61 \cdot 10^{-8} *$
Cld5 <sub>R145A</sub>	$9,34 \cdot 10^{-6} \pm 5,91 \cdot 10^{-7} **$
Cld5 <sub>Y148A</sub>	$6,78 \cdot 10^{-6} \pm 4,29 \cdot 10^{-7} *$
Cld5 <sub>K157A</sub>	$7,36 \cdot 10^{-6} \pm 4,82 \cdot 10^{-7} *$
Cld5 <sub>Y158A</sub>	$6,26 \cdot 10^{-6} \pm 3,96 \cdot 10^{-7} *$
Cld5 <sub>E159Q</sub>	$7,17 \cdot 10^{-6} \pm 4,53 \cdot 10^{-7} *$

Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Vektorkontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n \geq 10$ .

**Tabelle S24:  $P_{\text{coeff}}$  (FD10) der FLAG-Cld5 exprimierenden MDCK-II-Zellen**

FLAG-Cld5-Protein	$P_{\text{coeff}}$ (FD10) (cm/s, MW $\pm$ SEM)
Vektorkontrolle	$3,72 \cdot 10^{-7} \pm 1,6 \cdot 10^{-8}$
Cld5 <sub>wt</sub>	$2,63 \cdot 10^{-7} \pm 3,31 \cdot 10^{-8}$
Cld5 <sub>R145A</sub>	$4,52 \cdot 10^{-7} \pm 3,06 \cdot 10^{-8}$

Cld5 <sub>Y148A</sub>	$7,29 \cdot 10^{-7} \pm 7,04 \cdot 10^{-8} *$
Cld5 <sub>K157A</sub>	$4,49 \cdot 10^{-7} \pm 4,29 \cdot 10^{-8}$
Cld5 <sub>Y158A</sub>	$8,99 \cdot 10^{-7} \pm 1,88 \cdot 10^{-7} *$
Cld5 <sub>E159Q</sub>	$8,92 \cdot 10^{-7} \pm 1,09 \cdot 10^{-7} **$

---

Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Vektorkontrolle gemäß Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *Dunn's post-Test*,  $n \geq 10$ .

## Publikationen

### *Peer-reviewed journals*

Zhang J., Piontek J., Piehl C., Liss M., Wolburg H., Abdelilah-Seyfried S., Blasig I. E. Establishment of an ependymal brain barrier system by zebrafish Claudin-5 precedes blood-brain barrier formation. Eingereicht.

Piontek J., Winkler L., Wolburg H., Müller SL., Zuleger N., Piehl C., Wiesner B., Krause G., Blasig I.E. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins, FASEB J. 2008 Jan;22(1):146-58

### Vorträge

Piehl C., Piontek J., Winkler L., Blasig I. E. The influence of the second extracellular loop of claudin-5 on tight junction integrity. DFG-Forschergruppe FOR 721, Forschergruppentagung, Berlin, 14.10.2008

Piehl C., Blasig I.E. Die Rolle der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 bei der Formation von tight junctions und der Ausbildung parazellulärer Dichtigkeit" 4. Klausurtagung des Forschungsinstituts für Molekulare Pharmakologie, Schmilka, 27. - 30.08.2006

### Posterpräsentationen

Piehl C., Piontek J., Winkler L., Blasig I.E. Selective manipulation of the paracellular resistance of epithelial cells using Claudin-5 mutants, Claudin peptides and clostridium perfringens enterotoxine fragments. 11<sup>th</sup> International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, Amsterdam, Niederlande, 18. -20.09. 2008

Piehl C., Piontek J., Winkler L., Blasig I.E. Functional effect of a mutant of the second extracellular loop of Claudin-5 in the blood-brain barrier. Berlin Neuroscience Forum 2008, Liebenwalde, 05. - 07.06.2008

Piehl C., Piontek J., Winkler L., Couraud P.O., Blasig I.E. Investigations of the tight junction protein arranged transepithelial electrical resistance (TER) in epithelial and endothe-

lial cells. 10<sup>th</sup> International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, Potsdam, 13. - 16.09. 2007

Piehl C., Piontek J., Winkler L., Hagen V., Oschkinat H., Diehl A., Krause G., Vargas C., Blasig I.E. Impedance analysis of junctional cell-cell contacts in epithelial and endothelial cells. 9<sup>th</sup> International Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, Salzburg, Österreich, 07. - 10.09.2006

Piehl C., Winkler L., Piontek J., Blasig I.E. Functional investigation of the role of the second extracellular loop of claudin-5 in tight junction formation. Berlin Neuroscience Forum 2006, Liebenwalde, 08. - 10.06.2006

## Danksagung

Am Ende möchte ich all denjenigen danken, ohne deren freundliche Hilfe, Anregung und Unterstützung diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte mich bei PD Dr. Ingolf E. Blasig bedanken, der mir dieses interessante Thema überlassen und die Möglichkeit gegeben hat, durch Mitarbeit an hochrangigen Konferenzen mit dem *who-is-who* der *tight junction* Forschung ins Gespräch zu kommen.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Werner Kloas vom Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei für die Betreuung und Begutachtung dieser Doktorarbeit.

Eine ganz besonders große Hilfe war mir Dr. Jörg Piontek. Obwohl stets von allen beansprucht, stand er mir immer mit Rat und Tat zur Seite, wies den richtigen Weg und erteilte mir die eine oder andere Abreibung beim Tischtennis oder Tipp-Kick.

Auch sollen an dieser Stelle Dörte, Juliane und Lars erwähnt werden, die mich herzlich im Kreise der Doktoranden aufgenommen und mir daher den Einstieg in den Arbeitsalltag sehr erleichtert haben.

Frau Barbara Eilemann möchte ich für die technische Assistenz und Dr. Reiner Haseloff für die zahlreichen und unterhaltsamen Gespräche nicht nur während der Mittagspause danken - und natürlich für den guten Kaffee!

Schließlich möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Schwägerin danken, die mir während der gesamten Zeit hilfreich zur Seite standen. Das gleiche gilt auch für die Familie meiner Frau, die mich ebenfalls unterstützte, wo sie konnte.

Doch am allermeisten und herzlichsten möchte ich meiner lieben Frau Susanne danken, die für mich auch an verregneten Tagen die Sonne scheinen ließ.

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zu parazellulären Barriereigenschaften von Claudinen“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Desweiteren erkläre ich meine Kenntnisnahme der dem angestrebten Verfahren zugrunde liegenden Promotionsverordnung. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und bin nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades.

Berlin, den .....

.....

Christian Piehl